

N° D'ORDRE :

18

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE CAEN

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'UNIVERSITÉ DE CAEN

(Mention Sciences)

PAR

M. TSI YA TANG (齊雅堂)

1^{re} Thèse : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION DES ANTICRYPTOGAMIQUES SUR LA CUTICULE.

2^e Thèse : LA SEXUALITÉ CHEZ LES EUMYCÈTES (Basidiomycètes et Ascomycètes)

Soutenues le 4 Janvier 1934 devant la Commission d'Examen

MM. CHAUVENET...
CHOUX
BOUYGUES....
WARCOLLIER. }

Président.

Examineurs.

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1933



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546417_0016

N° D'ORDRE :
18

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE CAEN

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'UNIVERSITÉ DE CAEN

(Mention Sciences)

PAR

M. TSI YA TANG (齊雅堂)

1^{re} Thèse : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION DES ANTICRYPTOGAMIQUES SUR LA CUTICULE.

2^e Thèse : LA SEXUALITÉ CHEZ LES EUMYCÈTES (Basidiomycètes et Ascomycètes).

Soutenues le 4 Janvier 1934 devant la Commission d'Examen

MM. CHAUVENET...
CHOUX
BOUYGUES.....
WARCOLLIER.

Président.

Examineurs,

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1933

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen : M. BLANC (*, I. ☉).

Assesseur : M. ZORETTI (I. ☉).

Doyen honoraire : M. BIGOT (*, I. ☉, C^r de Saint-Sava), correspondant de l'Institut.

Professeur honoraire : M. MAURAIN (O. *, I. ☉), Doyen de la Faculté des Sciences de l'Université de Paris.

M. ZORETTI (I. ☉), professeur (*Mécanique*).

M. BLANC (*, I. ☉), professeur (*Physique et Minéralogie*).

M. L. MERCIER (*, I. ☉), professeur (*Zoologie et Physiologie animale*).

M. CHAUVENET (I. ☉), professeur (*Chimie*).

M. JANET (*, I. ☉), professeur (*Calcul différentiel et intégral*).

M. le Docteur CHOUX (*, †, I. ☉), professeur (*Botanique*).

M. DANGEARD, professeur (*Géologie et Paléontologie*).

M. AUDIGÉ (*, †, I. ☉, ☿), professeur (*Zoologie*).

M. le Docteur BOUYGUES (*, I. ☉, O. ☿), professeur (*Botanique*).

M. QUELET (†, A. ☉), maître de conférences (*Chimie*).

M. LE ROUX (I. ☉), maître de conférences (*Physique*).

Secrétaire : M. ROUX (I. ☉, ☿, †).



A MON MAITRE

LE DOCTEUR HENRI BOUYGUES

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE CAEN

Faible témoignage de ma bien vive
gratitude et de mon affectueuse
reconnaissance.

A MADAME BOUYGUES

AUX FAMILLES SALES ET DEBATS

En reconnaissance des sentiments
affectueux dont elles m'ont tou-
jours entouré.

Avant de nous éloigner de cette belle terre de France qui nous fut si puissamment hospitalière, pendant dix années, qu'il nous soit permis de dire toute notre reconnaissance à nos maîtres, à nos amis.

Grâce à eux, en effet, nous avons pu poursuivre les recherches que M. le Professeur Bouygues nous avait confiées. Merci à M. le Professeur Choux d'avoir bien voulu continuer à nous donner une hospitalité large dans la salle des travaux pratiques de la licence et d'avoir bien voulu nous faire le grand honneur de nous confier la mise au point d'une question des plus intéressantes comme sujet de seconde thèse. Merci encore à M. Meslin, assistant de Botanique, et à M^{lle} Couvreur, licenciée ès sciences naturelles, qui ont toujours mis à notre disposition leurs sûres connaissances, qui ne nous ont pas ménagé leurs conseils et qui nous ont si fortement secondés dans la rédaction de notre travail.

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE

L'ACTION DES ANTICRYPTOGAMIQUES SUR LA CUTICULE

INTRODUCTION

Au cours des études qu'il avait entreprises sur la biologie du Mildiou, MILLARDET (1) avait été amené à rechercher le lieu de localisation du cuivre dans la feuille de vigne.

En 1885, en effet, SCHLÆSING (2) émettait l'opinion que le cuivre pouvait être absorbé par la plante en assez grande quantité pour donner aux liquides constitutifs des feuilles une concentration incompatible avec le développement du parasite.

(1) A. MILLARDET. — Effets du Mildiou sur la vigne. Influence d'un traitement efficace. (*C. R. Acad. sciences.*, t. CI, p. 692, 1886.)

— Sur le traitement du Mildiou et du Rot. (*C. R. Acad. sciences*, t. CI, p. 657, 1886.)

— De l'action du mélange de sulfate de cuivre et de chaux sur le Mildiou. (*C. R. Acad. sciences*, t. CI, p. 929, 1886.)

— Recherche du cuivre sur les ceps de vignes traités par le mélange de chaux et de sulfate de cuivre, et dans la récolte. (*C. R. Acad. sciences*, t. CI, p. 985, 1886.)

— Le cuivre, dans la récolte des vignes soumises à divers procédés de traitement du Mildiou par composés cuivreux. (*C. R. Acad. sciences*, t. CIII, p. 1240, 1887.)

(2) SCHLÆSING. — *Bulletin de la Soc. nat. d'agriculture de France*, 11 nov. 1885.

Par contre, en 1886, CORNU (3) pensait que ce cuivre était plutôt retenu par les membranes cellulaires que par le tube mycélien provenant des zoospores arrêtées et obligé de percer l'épiderme de la face supérieure du limbe pour provoquer l'infection des feuilles.

Il était donc de toute importance de chercher qui, de ces deux savants, avait raison. Et c'est ce que MILLARDET entreprit, dès 1887, en collaboration étroite avec son éminent collègue, le Professeur GAYON. Etant donnée l'importance qu'a pour notre travail cette recherche, qu'il nous soit permis de rapporter ici, *in-extenso*, la description qu'en a donnée MILLARDET lui-même :

« Des feuilles bien saines de *Vitis riparia* sont cueillies, débarrassées du pétiole et coupées en fragments de deux centimètres carrés environ. Le poids total de ces fragments est de 31 grammes à l'état frais.

« Ces 31 grammes sont mis à digérer dans un kilogr. d'acide sulfurique monohydraté du commerce, additionné de 180 grammes d'eau. On remue le mélange de temps en temps. Après vingt-quatre heures, le tissu des feuilles est détruit, sauf la cuticule qui surnage. On ajoute plusieurs volumes d'eau et on lave sur un tamis, sous un robinet. Les restes des cellules les plus résistantes et quelques débris de matière charbonneuse qui adhéraient encore, sur quelques points aux lambeaux de cuticule, sont détachés et entraînés par le courant; et la cuticule, sensiblement pure, reste seule sur le tamis. Ce résidu, jeté dans l'eau, se présente sous forme de membranes, de paillettes, de flocons de couleur ambrée. On le laisse macérer dans l'eau pendant quelque temps pour faire disparaître toute acidité.

« Recueillis à nouveau et réunis sur un tamis, ces lam-

(3) MAX. CORNU. — *Bulletin de la Soc. nat. d'agriculture de France*, 24 mars 1886.

(4) A. MILLARDET et U. GAYON. — *Recherches sur les effets des divers procédés de traitement du Mildiou par les composés cuivreux*, Bordeaux, 1887.

beaux se présentent sous forme d'un magma brunâtre. Pressés avec un papier tournesol, ils sont neutres de réaction. Après avoir été serrés fortement à plusieurs reprises dans un linge sec, ils accusent à la balance un poids total de 1 gr. 10.

« Toute cette cuticule est mise dans 100 centimètres cubes de solution de sulfate de cuivre contenant 10 milligr. de cuivre. Les lambeaux se désagrègent aussitôt et flottent dans la solution. Après vingt-quatre heures, le liquide est filtré et la cuticule, recueillie de nouveau, est mise à macérer dans 100 centimètres cubes d'eau distillée. On filtre, on la dessèche à 100 degrés, puis elle est pesée (poids 0 gr. 350), incinérée, et les cendres (poids 0 gr. 033) sont soumises à l'électrolyse.

« Voici les quantités de cuivre constatées :

« Dans 100 centimètres cubes de solution de sulfate de cuivre gardés comme témoins 10 mmgr. »

« Dans la solution où la cuticule a baigné pendant vingt-quatre heures..... 0 mmgr. 1

« Dans l'eau distillée où elle a baigné à nouveau 0 mmgr. »

« Dans les cendres de la cuticule,..... 9 mmgr. 8

TOTAL..... 9 mmgr. 9

« Au lieu de 10 milligrammes que contenait la solution.

« Cette expérience montre qu'en vingt-quatre heures la cuticule avait absorbé presque tout le cuivre de la solution dans laquelle elle se trouvait. Elle montre, de plus, fait de la plus haute importance, que ce cuivre était retenu par elle avec une si grande énergie que, même après vingt-quatre heures de séjour dans l'eau, elle n'en avait pas perdu la moindre trace. »

MILLARDET, une fois ce premier résultat obtenu, tint à se faire une opinion sur la rapidité avec laquelle la cuticule fixe le cuivre et, pour cela, il entreprit les deux expériences suivantes :

1^{re} Expérience. — « 60 grammes de feuilles de *Vitis rubra* traitées comme dans l'expérience précédente, toutes proportions gardées, ont donné 3 gr. 2 de cuticule humide qui, deséchés à 100 degrés, se sont trouvés peser 0 gr. 970 et ont donné par l'incinération 0 gr. 075 de cendres.

« Toute cette cuticule humide (3 gr. 2), neutre au tournesol, est mise dans 250 centimètres cubes d'une solution de sulfate de cuivre contenant, comme dans l'expérience précédente, 10 milligrammes de cuivre pour 100 centimètres cubes de liqueur.

« Cuivre trouvé par l'électrolyse :

« Dans 50 cc. de liqueur témoin.....	5 mmgr. »
« Dans 50 cc. de la liqueur où baigne la cuticule, après deux heures et demie de contact	1 mmgr. 25
« Dans 50 cc. après cinq heures	1 mmgr. »
« Dans 50 cc. après dix heures.	0 mmgr. 75
« Dans 50 cc. après vingt-quatre heures..	0 mmgr. 70
« Dans 50 cc. liqueur restant	0 mmgr. 70
« Dans les cendres de la cuticule	20 mmgr. 50
TOTAL.....	24 mmgr. 90

« Au lieu de 25 milligrammes qui avaient été mis. »

2^e Expérience. — « 2 gr. 7 de cuticule humide de *Vitis rupestris*, pesant 0 gr. 840 à l'état sec, ont donné 0 gr. 065 de cendres.

« Le tout a été mis dans 250 centimètres cubes de solution de sulfate de cuivre contenant 25 milligrammes de cuivre.

« Cuivre trouvé par l'électrolyse :

« Dans 50 cc. de liqueur témoin.....	5 mmgr. »
« Dans 50 cc. de la liqueur en contact avec la cuticule après une demi-heure	2 mmgr. 5
« Dans 50 cc. de la liqueur en contact avec la cuticule après une heure.	1 mmgr. 8
A reporter	4 mmgr. 3

<i>Report</i>	4 mmgr. 3
« Dans 50 cc. de la liqueur en contact avec la cuticule après une heure et demie.....	0 mmgr. 8
« Dans 50 cc. de la liqueur en contact avec la cuticule après deux heures.....	1 mmgr. 2
« Dans 50 cc. de liquide restant après deux heures et demie	1 mmgr. 2
« Dans les cendres de la cuticule après deux heures et demie.....	17 mmgr. »
TOTAL.....	24 mmgr. 5

« Au lieu de 25 milligrammes employés. »

Et, après ces deux expériences, MILLARDET de conclure :
« Ces deux expériences montrent avec quelle rapidité se fait l'absorption du cuivre par la cuticule, puisque, après une demi-heure seulement, la moitié du cuivre de la liqueur avait été absorbée et que, après une heure et demie, dans une des expériences (2^e expérience), l'absorption de ce métal était terminée. »

De ce qui précède, il résulte que, pour MILLARDET et GAYON, *la cuticule fixait le cuivre; qu'elle le fixait encore très énergiquement, même après un séjour de vingt-quatre heures dans de l'eau pure et que, enfin, ce cuivre diffusait aussi dans les tissus sous-jacents de la feuille.*

Ces conclusions furent admises sans conteste, eu égard à la notoriété de ceux qui les avaient établies et eurent, pour ainsi dire, force de loi dans toutes les régions viticoles.

Mais, en 1901, M. le professeur DEVAUX (5), ayant entrepris des recherches sur l'histologie des parois cellulaires, arriva à reconnaître une propriété importante de celles-ci. « Elles s'emparent avec avidité, dit-il, des bases métalliques présentées sous forme de combinaisons salines solubles. Mais cette propriété n'appartient qu'aux parties pectiques des

(5) H. DEVAUX. — Sur les réactifs colorants des substances pectiques. (*Actes de la Soc. Linn. Bordeaux*, vol. LVI, 6^e série, t. VI, p. xxxiii, Bordeaux, 1901.)

parois. Car ni la cutine, ni la subérine, ni la callose ne fixent ces bases métalliques. »

Les résultats obtenus par M. DEVAUX étaient donc nettement en contradiction avec ceux de MILLARDET et GAYON. Pour ces derniers, en effet, la cuticule fixait les sels de cuivre; pour M. DEVAUX, au contraire, elle ne les fixait pas.

Du reste, ces savants étaient encore en désaccord sur d'autres points, car MILLARDET et GAYON admettaient que les feuilles traitées par eux étaient insensibles à l'action du cuivre, tandis que DEVAUX, à la suite de nouvelles recherches (6), concluait de la façon suivante :

« 1° Les plantes phanérogames ou cryptogames sont empoisonnées par des solutions de sels de plomb ou de cuivre diluées à quelques dix-millionièmes ou moins encore ;

« 2° Le métal est, à la fin, fixé par toutes les parties de la cellule, membrane, protoplasma, noyau, et peut y être dévoilé par les réactifs ;

« 3° Le métal est inégalement fixé par les diverses parties de la cellule. Ce sont d'abord, ou exclusivement, la membrane, puis le noyau et le nucléole (*Spirogyre*), enfin le protoplasma.

« Il y a lieu de distinguer pour un poison, ou, d'une manière plus générale, pour l'absorption des substances, l'influence de la dilution et l'influence de la masse absolue.

« Mais, dans tous les cas, cette absorption est sensible, même pour des dilutions excessives, représentant parfois moins de 1 milligramme par hectolitre. »

La question en était restée là lorsque M. BOUYGUES, qui avait été à la fois l'élève de MM. MILLARDET, GAYON et DEVAUX, et qui était aussi, à ce moment, l'assistant de ce

(6) H. DEVAUX. — De l'absorption des poisons métalliques très dilués par les cellules végétales. (*C. R. Acad. sciences*, t. CXXXII, p. 717, 1901.)

dernier, eut l'idée de la reprendre. Il étudia (7) donc la cuticule de la feuille de vigne à l'état frais et ses recherches l'amènèrent à formuler les conclusions suivantes :

« 1° La cuticule de la feuille de vigne ne fixe pas le cuivre, du moins en quantité appréciable. Il est même très douteux qu'elle fixe ce métal et, en tout cas, si elle le fait, ce n'est qu'à l'état de traces infinitésimales.

« 2° Cette absence de fixation du métal est indépendante de la nature de l'acide auquel le cuivre est combiné dans la solution saline.

« 3° Il s'en suit, avec une probabilité très grande, que la cuticule traitée au cuivre n'est pas rendue invulnérable aux tubes germinateurs des spores.

« Elle ne pourrait ainsi prévenir d'elle-même une infection générale de la feuille postérieurement au traitement cuprique et après que la réserve d'hydrate d'oxyde de cuivre de la bouillie bordelaise est épuisée à la surface de la feuille. »

Sitôt que le travail de M. BOUYGUES eut paru, le Professeur GAYON (8), qui vivait encore à ce moment, alors que MILLARDET n'était plus, fit la critique des résultats obtenus par M. BOUYGUES (9). Mais celui-ci fit remarquer à M. GAYON qu'ils ne s'étaient pas placés dans les mêmes conditions d'expérimentation; qu'il avait exclusivement effectué ses recherches sur de la cuticule fraîche, tandis que MM. MILLARDET et GAYON s'étaient servis de cuticule violemment traitée par l'acide sulfurique; que celle-ci pouvait être plus ou moins transformée, plus ou moins impure et, par conséquent, que les résultats, quoique nettement opposés, pouvaient être vrais dans les deux cas.

(7) H. BOUYGUES. — La cuticule et les sels de cuivre. Première partie : La cuticule fixe-t-elle les sels de cuivre ? (Extrait des *Pr.-Verb. de la Soc. Linn. Bord.*, 4 février 1903.)

(8) GAYON. — Sur l'absorption du cuivre par la cuticule de la feuille de vigne. (*Procès-verbaux des séances de la Soc. des sciences physiques et naturelles de Bordeaux*, année 1902-1903, p. 76.)

(9) BOUYGUES. — *Op. supra cit.* ; cf. p. 13 de l'extrait.

De sorte que, malgré ces savantes recherches effectuées par des chercheurs de premier plan, la question restait entière. Car, pour les uns, la cuticule ne fixait pas les sels métalliques, et en particulier les sels de cuivre; pour les autres, au contraire, elle les fixait.

C'est alors qu'ayant demandé à M. le professeur BOUYGUES un sujet d'études, celui-ci me proposa de reprendre ce problème pour tâcher de le résoudre d'une manière définitive. Nous acceptons avec d'autant plus d'empressement sa proposition que l'importance capitale de la solution de ce problème ne nous échappait point. Reconnaître, en effet, si la cuticule est vraiment susceptible de fixer des corps nocifs à l'égard des filaments mycéliens; trouver le moyen de la rendre invulnérable à tout moment du développement foliaire et la transformer en une réserve de matière toxique susceptible d'enrayer, tout net, la germination des spores, c'était faire effectuer au problème si complexe de la lutte contre les maladies cryptogamiques un bien grand pas et, partant, rendre service aux agriculteurs.

Nous avons donc abordé, à notre tour, ce délicat problème. Et, dans ce qui va suivre, nous exposerons les recherches que nous avons personnellement effectuées, ainsi que les conclusions auxquelles nous sommes arrivé d'une manière tout à fait indépendante.

CHAPITRE PREMIER

Généralités sur la constitution histologique de la paroi externe des cellules épidermiques.

Mais, avant d'exposer nos recherches, étant donnée leur nature, nous avons jugé qu'il était de quelque importance de rappeler brièvement, ici, les faits connus sur la constitution histo-chimique de la paroi externe des cellules épidermiques. Il semble, en effet, qu'on oublie trop, aujourd'hui, dans un travail de fond, de rappeler les travaux anciens ! Cependant, ce faisant, on accomplit un acte de justice et, aussi, de probité scientifique. Et c'est ce résumé que nous allons exposer maintenant.

COUP D'ŒIL GÉNÉRAL SUR L'HISTOCHIMIE DE LA CUTICULE

C'est B. DE SAUSSURE (1) qui, en 1762, se douta le premier de la présence de la cuticule à la surface des feuilles et de la jeune tige; et c'est HEDWIG (2) qui, en 1784, fut le premier à en constater l'existence. Mais, en 1813, DE CANDOLLE (3) alla encore plus loin, car il remarqua que cette membrane

(1) B. DE SAUSSURE. — Voir ACHILLE RICHARD : *Nouveaux éléments de Botanique*, p. 35. Librairie Savy, Paris, 1876.

(2) I. HEDWIG. — *Theoria generationis et fructificationis Plantarum cryptogamicarum Linnæi*, p. 45, Petropoli, 1784.

(3) A.-P. DE CANDOLLE. — *Théorie élémentaire de la Botanique*, p. 315, Paris, 1813.

mince et transparente, « qui recouvre toute la superficie des plantes, se détache plus ou moins facilement du reste du tissu et paraît être la paroi externe des cellules extérieures durcie et fortifiée par l'action de l'air et l'effet de l'évaporation. » Autrement dit, DE CANDOLLE donnait nettement son opinion sur les causes de la formation de la cuticule.

Ensuite, GARREAU (4), en 1850, publia une série d'observations de plus haut intérêt et conclut nettement, à la suite de celle-ci, que la cuticule n'est pas un produit de sécrétion. Puis, par des procédés chimiques très délicats, ce savant parvint à isoler assez de cuticule pour en faire l'analyse chimique. Celle-ci lui révéla que la composition brute de la cuticule peut être représentée par la formule suivante, $C_{17}H_{16}O_5$: formule qui, à part l'oxygène, lui parut analogue à celle du caoutchouc et, partant, entièrement différente de la constitution du reste de la membrane des cellules épidermiques.

Trente-six ans plus tard, c'est-à-dire en 1866, ALEXIS POTOUNNIKOW (5) considéra la cuticule comme se formant aux dépens de la paroi externe des cellules épidermiques par une transformation progressive dont le résultat est la substitution complète de la cutine à la cellulose. Pour lui, la cuticule, une fois formée, ne pouvait plus s'accroître (6). De plus, elle était susceptible de subir quelquefois des modifications chimiques la transformant en résine ou en cire. Pour lui encore, la cuticule se dissolvait dans l'acide chromique, mais plus difficilement que la cellulose et la substance ligneuse. Par contre, elle ne se dissolvait pas dans l'acide sulfurique, se saponifiait par l'action de la

(4) J. GARREAU. — Sur la nature de la cuticule, ses relations avec l'ovule. (*C. R. Acad. sciences*, t. XXXI, p. 307, 1850.)

(5) ALEXIS POTOUNNIKOW. — Recherches physiologiques sur les transformations successives des parois des cellules et sur la genèse. (*Bull. de la Soc. Bot. France*, p. 243, 27 avril 1866.)

(6) Nous éclairons le texte de l'auteur en ajoutant : « en épaisseur ».

potasse et s'oxydait par l'action de l'acide nitrique. Quant aux couches cuticulaires, elles se formaient aux dépens des parois des jeunes cellules par une transformation progressive de la cellulose en cutine, laquelle commençait à la surface. Mais la transformation n'était jamais complète dans les cellules de l'épiderme. De plus, avec l'âge, cette transformation ne s'arrêtait pas. C'est pourquoi les couches cuticulaires pouvaient s'accroître (7).

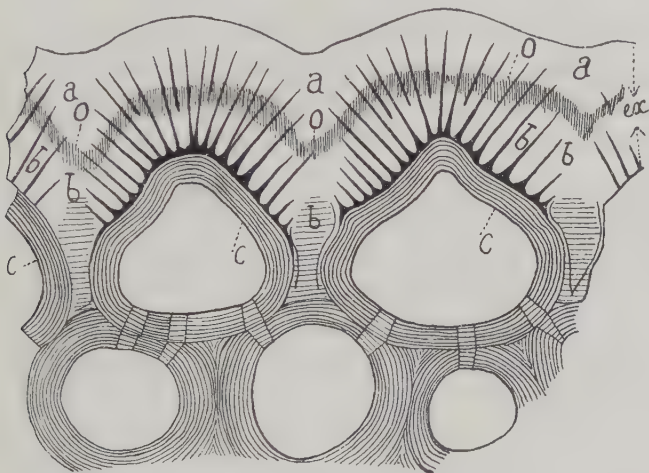


FIG. 1.

Coupe transversale d'*Ilex aquifolium*. (D'après SACHS.)

Pour POTOUNNIKOW, la cutinisation n'était donc pas une imprégnation, mais une modification chimique de la membrane externe des cellules épidermiques.

Vint ensuite SACHS (8), qui, en 1874, condensa dans son remarquable *Traité de Botanique* l'ensemble des données acquises jusqu'à ce jour sur la cuticule. Et, à ce propos, qu'on nous permette de citer *in-extenso* le passage qui lui

(7) Nous éclairons encore ici le texte de l'auteur en ajoutant les mots : « en épaisseur ».

(8) J. SACHS. — *Traité de Botanique*, traduit par VAN TIEGHEM, pp. 46 et 112, Paris, 1874.

est consacré : « Dans les cellules épidermiques, la cuticularisation se limite tantôt à la face externe des cellules, tantôt envahit aussi leurs faces latérales, comme cela se voit très nettement, par exemple, à la surface inférieure des nervures des feuilles de Houx (*Ilex aquifolium*). Traite-t-on une coupe transversale très mince (fig. 1) par une dissolution de chloroiodure de zinc ? On voit, en employant un très fort grossissement (800 fois), la membrane de chaque cellule épidermique composée de deux enveloppes, dont l'intérieure plus molle, plus gonflée (C), se colore en bleu sombre, pendant que l'enveloppe externe (*ex*) ne prend pas cette coloration. Cette dernière se décompose à son tour en deux zones chimiquement distinctes : une intérieure (*b*), qui se colore en jaune et pénètre latéralement entre les cellules, et une extérieure, qui demeure incolore (*a*) et s'étend, sans discontinuité, sur toutes les cellules en formant ce qu'on appelle la vraie cuticule. Entre ces deux zones (*a*) et (*b*), on remarque encore une zone intermédiaire qui, dans certaines positions du microscope, se dessine comme une ombre (O).

.....

« Souvent, et en particulier dans les feuilles et les entrenœuds charnus, la face externe des cellules épidermiques, située sous la cuticule, est fortement, souvent même énormément épaissie, pendant que leur face interne demeure mince et que les faces latérales, fortement épaissies en dehors, s'amincissent brusquement en dedans. La région de la paroi ainsi épaissie est le plus souvent différenciée en deux enveloppes. L'enveloppe interne, mince, entourant immédiatement la cavité cellulaire, manifeste les réactions de la cellulose pure, pendant que les couches, situées entre elle et la cuticule, sont plus ou moins cuticularisées, et d'autant plus, qu'elles sont plus rapprochées de la cuticule. Il n'est pas rare de voir ces couches cuticulaires descendre dans la partie épaissie des parois latérales, dont la lamelle

moyenne se comporte alors comme la vraie cuticule à laquelle elle vient s'appuyer au dehors. »

En 1883 paraît le tome IX de la remarquable *Encyclopédie* de FRÉMY (9), où cet illustre savant fait faire un pas énorme à nos connaissances sur cet agent protecteur des organes aériens qu'est la cuticule.

Dans les premières études qu'il a faites, en effet, sur les tissus végétaux, FRÉMY a donné le nom de *cutose* à la substance qui constitue la membrane fine et transparente que les parties aériennes des végétaux présentent à leur surface.

Puis, dans un travail publié en collaboration avec URBAIN, ces deux savants font connaître les propriétés remarquables de cette substance, que l'un d'eux, du reste, résume ainsi : « La cutose n'est pas seulement intéressante au point de vue de la physiologie végétale, mais elle présente aussi une importance réelle sous le rapport chimique. Elle vient, en quelque sorte, se placer entre les corps gras et les substances résineuses. »

Puis, après avoir donné une méthode pour obtenir la cutose, il ajoute : « L'épiderme ainsi obtenu est recouvert de corps gras et résineux qu'on dissout par l'alcool et l'éther; viennent ensuite deux membranes qui sont soudées l'une à l'autre : la première est à base de paracellulose, qui devient soluble dans le réactif ammoniac-cuivrique, après l'action des acides, et que l'on sépare ainsi; l'autre est formée de cutose que l'on obtient facilement à l'état de pureté.

.....
« La cutose pure jouit des propriétés suivantes : elle est d'une grande stabilité, car elle résiste à l'action de réactifs énergiques, tels que l'acide sulfurique trihydraté, l'acide chlorhydrique et l'ammoniaque.

« La cutose est attaquée rapidement par l'acide nitrique

(9) FRÉMY. — *Encyclopédie chimique*, t. IX : Chimie biologique et Chimie physiologique, 2^e section; Chimie des végétaux, 1^{er} fascicule : Structure de la plante, p. 10, Paris, 1883.

et produit, dans ce cas, d'abord des acides résineux et, en dernier lieu, de l'acide subérique. L'intérêt que présente la cutose, au point de vue chimique, résulte des modifications que cette substance éprouve par l'action des alcalis.

« Les dissolutions alcalines étendues et les carbonates alcalins ne réagissent que lentement sur la cutose. Mais, par une ébullition prolongée, la potasse, la soude, la baryte, la chaux changent cette substance en deux acides comparables aux acides gras. L'un est solide, nous l'avons nommé stéaro-cutique. L'autre est liquide, nous l'appelons oléocutique.

« Cette réaction ne produit pas de corps complémentaires comparables à la glycérine. Nous ne l'assimilons donc pas à une saponification.

.....
« La cutose extraite par des méthodes différentes présente la composition suivante :

Cutose des feuilles de Lierre.

PRÉPARÉE PAR LE RÉACTIF
CUIVRIQUE

C = 68,424
H = 9,477
O = 22,009

PRÉPARÉE PAR $\text{SO}_3, 3\text{HO}$

= 68,01
= 9,80
= 22,19

Cutose des feuilles d'Agave

EXTRAIT PAR MACÉRATION

C = 68,293
H = 9,553
O = 22,154

« En considérant la cutose comme formée par la combinaison de cinq équivalents d'acide oléocutique et d'un équivalent d'acide stéaro-cutique, ce qui représente les pro-

portions des deux acides que nous obtenons par la décomposition de la cutose, on arrive à une composition théorique de cutose qui se rapproche beaucoup de celle que nous avons trouvée par l'expérience.

$$C = 68,181$$

$$H = 10,000$$

$$O = 21,819$$

« Les faits qu'il nous reste à faire connaître nous paraissent confirmer les considérations théoriques que nous venons de présenter.

« Après avoir reconnu que la cutose n'éprouvait pas de saponification par l'action des alcalis, mais un simple dédoublement, nous avons cherché à reconstituer par la synthèse, la cutose, en faisant usage des deux acides qui résultent de sa décomposition.

« Nos essais étant une fois engagés dans cette voie nous ont donné des résultats très intéressants.

« Nous avons constaté, en effet, que, sous des influences nombreuses, les deux acides stéaro- et oléo-cutiques pouvaient éprouver des modifications profondes et se rapprocher de la cutose par leurs propriétés. Ils perdent, en effet, leur solubilité dans l'alcool, dans l'éther, et même dans les dissolutions alcalines étendues : l'acide solide (stéaro-cutique), dont le point de fusion était d'abord de 76°, ne fond plus qu'à 95° ; l'acide liquide (acide oléo-cutique) devient membraneux et insoluble dans l'alcool et l'éther. En un mot, un mélange des deux acides peut prendre les caractères principaux de la cutose et se comporter ensuite comme elle sous l'influence des alcalis.

« Cette transformation curieuse des deux acides dérivés de la cutose se produit, soit sous l'influence d'une température de 100° prolongée pendant longtemps, soit par l'action de la lumière. Elle s'opère aussi facilement dans

des tubes scellés que dans l'air : ce qui démontre que cette transformation est réellement isomérique.

« Nous avons, du reste, reconnu par l'analyse que les deux acides, pris sous leurs deux modifications, présentent la même composition.

« Nous devons dire qu'il existe toujours dans la cuticule des feuilles une certaine quantité de chaux et de phosphate de chaux.

« Le fait que nous venons de signaler pour les acides de la cutose, c'est-à-dire leurs modifications isomériques sous l'influence de la chaleur ou de la lumière, doit s'étendre à un certain nombre de corps gras ou résineux. En effet, nous avons trouvé à la surface des feuilles un corps résineux soluble dans l'alcool qui présente la composition suivante :

*Corps résineux, soluble dans l'alcool,
qui recouvre la cuticule des feuilles :*

$$C = 69,26$$

$$H = 10,89$$

$$O = 19,57$$

« En soumettant ce corps à l'action de la chaleur, il perd sa solubilité dans l'alcool et conserve sa composition première, comme le prouve l'analyse que nous citons ici :

$$C = 69,16$$

$$H = 11,17$$

$$O = 19,95$$

« Telles sont les principales propriétés chimiques du corps qui constitue la cuticule. Cette substance présente une grande importance physiologique, car elle ne se trouve pas seulement à la surface des feuilles, des fleurs, des fruits et des tiges, mais elle pénètre souvent à l'intérieur des organes.

Nous avons trouvé, en effet, jusqu'à 43 % de cutose dans le liège. Il existe aussi des quantités notables de ce corps dans les faisceaux fibreux du chanvre, du lin et de la ramie. Les opérations du blanchiment ont pour but, principalement, l'élimination de la cutose. »

Comme on le voit, les recherches de FRÉMY et URBAIN sur la cuticule sont de premier plan. Elles nous apprennent, en effet, que la cutose, c'est-à-dire la substance fondamentale de la cuticule, résiste aux réactifs énergiques tels que l'acide sulfurique trihydraté, l'acide chlorhydrique, l'ammoniaque; que, par contre, elle est rapidement attaquée par l'acide nitrique (10), tandis que les dissolutions alcalines étendues et les carbonates alcalins ne réagissent que lentement sur elle à la température ordinaire; que, à l'ébullition, avec ces mêmes corps, elle donne naissance à deux acides : l'acide stéaro-cutique et l'acide oléo-cutique, tous deux comparables aux acides gras; que le mélange de ces deux corps peut prendre, sous l'influence de la chaleur et simplement sous celle de la lumière, les caractères principaux de la cutose; que, enfin, la cutose se trouve aussi à l'intérieur des organes, voire même dans le liège, où il y en aurait 43 %, dans les faisceaux fibreux du chanvre, de la ramie, etc., etc.

De sorte que URBAIN et FRÉMY étendent le domaine de la cutose d'une façon considérable, et ce, grâce aux nombreuses analyses chimiques qu'ils ont faites à ce propos. Mais ils ne la confondent pas avec la vasculose, car FRÉMY dit à ce propos :

« La cutose offre quelques caractères communs avec la vasculose. Elle résiste, comme elle, à l'action de l'acide sulfurique bi-hydraté, mais elle en diffère par sa solubilité, à la pression ordinaire, dans les dissolutions étendues ou carbonatées de potasse et de soude. Elle contient plus d'hydrogène et de carbone que la vasculose; en outre, la

(10) Ils oublient de dire si c'est à chaud ou à froid. Or, pour nous, c'eût été important de le savoir, comme on le verra plus loin.

cutose, soumise à l'action de l'acide azotique, produit de l'acide subérique, tandis que la vasculose n'en forme pas. »

En 1884, VAN TIEGHEM (11), dans la première édition de son *Traité classique*, consacre à la cuticule quelques lignes, qui trouvent naturellement leur place ici. Il dit, en effet : « Les cellules de l'assise périphérique des tiges, des feuilles, des thalles, les cellules qui deviennent libres, comme les spores et les grains de pollen, transforment progressivement de dehors en dedans les couches externes de leur membrane en une substance différente appelée cutine, tandis que les couches internes demeurent à l'état de cellulose pure. Entre les deux, on trouve souvent une série de couches où la cellulose n'a subi qu'une transformation incomplète, où elle est seulement imprégnée de cutine. L'ensemble des couches complètement cutinisées forme ce qu'on appelle : la cuticule. Celles où la cutine n'existe qu'à l'état d'imprégnation sont dites cuticulaires. »

Et plus loin encore : « La cutine se colore en jaune ou en brun par l'iode et par le chlorure de zinc iodé ; elle fixe énergiquement les couleurs d'aniline, notamment la fuchsine, qui la colore en rose. Elle est insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther, dans le liquide cupro-ammoniacal et dans l'acide sulfurique concentré ; l'acide nitrique, et, mieux, le mélange d'acide nitrique et de chlorate de potasse, l'attaquent à l'ébullition et la décomposent en donnant notamment de l'acide subérique. Elle se dissout aussi dans la potasse concentrée et bouillante. Elle résiste indéfiniment à l'action corrosive du *Bacillus amylobacter* qui dissout, comme on sait, les couches restées à l'état de cellulose pure et, plus tard aussi, celles où la cellulose est seulement imprégnée de cutine. Sa composition chimique est ternaire, exempte d'azote et beaucoup plus pauvre en oxygène que la cellulose. Elle peut s'exprimer par la formule $C^{12}H^{10}O_2$. »

(11) VAN TIEGHEM. — *Traité de Botanique*, p. 571, Paris, 1884.

Enfin, il ajoute encore ceci, qui est d'une portée capitale : « Après ébullition dans l'acide nitrique ou la potasse, qui les débarrasse de la cutine, les couches cellulaires bleuissent de nouveau par le chlorure de zinc iodé et se dissolvent dans le liquide cupro-ammoniacal. »

Comme on le voit, VAN TIEGHEM, en résumant les recherches sur la cuticule, emploie indifféremment les mots transformation et imprégnation pour désigner la modification subie par la membrane externe des cellules épidermiques. Cependant, il y a lieu d'établir une différence, car le mot transformation implique l'idée de formation de substance nouvelle aux dépens d'une substance déjà existante. Or, il est probable que, dans l'esprit de VAN TIEGHEM, le mot transformation n'est pas pris dans ce sens, puisqu'il écrit aussi que le substratum cellulosique s'imprègne de cutine qui, lorsqu'elle est enlevée, permet à celui-ci de se colorer de nouveau à l'aide de ses colorants spécifiques.

En 1895, L. MANGIN (12) écrivait : « La membrane des *Péronosporées* est complexe. Elle est formée par l'association très intime de la cellulose et de la callose que l'on peut isoler séparément.

.....
.....

« Les appareils de fructification sont internes (oospores) ou externes (conidies). Les premiers participent de la constitution du mycélium; les seconds ont une constitution différente. Les arbres conidifères des *Péronosporées* et les basides des *Cystopées* sont, en effet, exclusivement constitués par de la cellulose, et la région externe de la membrane n'est jamais cutinisée. L'absence de revêtement de cutine dans les membranes exposées à l'air est significative; c'est un fait assez rare qui coïncide avec l'absence des composés

(12) L. MANGIN. — Recherches sur les *Péronosporées*. (Bull. Soc. Histoire nat. d'Autun; 8^e Bull., p. 106, 1895.)

pectiques. Et, dans le cas où la cutine devrait être considérée comme une substance dérivée de la membrane, elle serait un produit de transformation des composés pectiques et nullement de la cellulose

En 1896, dans les leçons qu'il professait au Collège de France, HENNEGUY (13) s'exprimait ainsi à propos de la cutine :

« Enfin, la cellulose de la partie externe des cellules épidermiques perd généralement une partie de son oxygène et se transforme en une substance, la cutine, $C_6H^{10}O$, qui présente une grande ressemblance avec la subérine; elle jaunit par l'iode, est insoluble dans les réactifs de Schweitzer, soluble dans la potasse concentrée et bouillante, et présente beaucoup d'affinité pour les couleurs d'aniline. »

En 1900, CRIÉ (14) disait, à propos de la cutinisation : « Dans les parties du corps de la plante qui sont en contact avec l'air extérieur (thalles, tiges, feuilles), dans les cellules qui deviennent libres (grains de pollen, spores), la membrane présente souvent le phénomène de la cutinisation. Les couches de la membrane se transforment, de l'extérieur vers l'intérieur, en une substance ternaire, la cutine, pauvre en oxygène et qui a pour formule $C^{12}H^{10}O_2$. Peu perméable aux liquides et aux gaz, la cutine est insoluble dans le bleu céleste; elle se colore non en bleu, mais en jaune ou en brun, par le chloroiodure de zinc. Elle fixe énergiquement les couleurs d'aniline; la fuchsine la colore en rose. On donne le nom de cuticule à l'ensemble des couches tout à fait cutinisées. »

En 1904, GAUCHER (15), résumant les connaissances histo-

(13) L.-F. HENNEGUY. — *Leçons sur la cellule*, p. 214 (G. Carré, éditeur, Paris, 1896).

(14) L. CRIÉ. — *Nouveaux éléments de Botanique*, p. 661 (O. Douin, éditeur, Paris, 1900).

(15) L. GAUCHER. — *Etude générale de la membrane cellulaire chez les Végétaux*, p. 199, Paris, 1904.

chimiques acquises, jusqu'à cette époque, sur la membrane rigide en général, écrivait, à propos de la cutine : « La cutine, ou cutose de FRÉMY, forme la cuticule qui revêt les cellules épidermiques et s'étend avec une épaisseur égale sur les poils. Très mince chez les plantes de climats humides où elle est directement appliquée contre la membrane pecto-cellulosique des cellules, la cuticule est beaucoup plus épaisse chez les plantes de climats secs, où elle est même renforcée, d'une manière générale, par les couches cuticulaires situées au-dessous d'elle et constituées par de la cutine mêlée aux substances pecto-cellulosiques. »

Puis il ajoutait : « D'après MANGIN, c'est aux dépens des composés pectiques que prend naissance la cutine... » L'opinion réservée de MANGIN devenait donc nettement une réalité, grâce à la manière de s'exprimer de GAUCHER.

Dans un premier travail, qui parut en 1906 (16), GÉNEAU DE LAMARLIÈRE faisait voir que, chez les plantes aquatiques et, en particulier dans leurs organes submergés, la cuticule, si mince qu'elle fût, laissait distinguer deux lames, superposées : l'épicuticule et la cuticule proprement dite. La substance fondamentale de ces lames serait, pour l'auteur, un composé pectique non mélangé de cellulose, auquel viendraient s'adjoindre des substances secondaires dont les principales sont : la cutine, une aldéhyde, un ou plusieurs corps azotés, des phosphates ou des silicates, et, quelquefois, de la lignine.

Dans un autre travail, paru en 1906 (17), le même auteur étudiait encore la cuticule des plantes terrestres et s'exprimait ainsi à leur sujet : «

.....
Les plantes terrestres ont un épiderme diversement constitué. Dans une première série, où la cuticule est mince, la

(16) GÉNEAU DE LAMARLIÈRE. — Sur les membranes cutinisées des plantes aquatiques. (*Rev. génér. Bot. France*, t. XVIII, p. 289, 1906.)

(17) GÉNEAU DE LAMARLIÈRE. — Sur l'épiderme des plantes aériennes. (*Rev. génér. Bot. France*, t. XVIII, p. 372, 1906.)

structure touche de près à celle de l'épiderme des plantes aquatiques : on y distingue une épicuticule et une cuticule formées fondamentalement de pectine, à laquelle se joignent la cutine, une aldéhyde, des corps azotés, des phosphates (ou silicates) et, très rarement, de la lignine. Mais, à l'état frais, la pectine a ses réactions masquées, dans presque toute l'étendue de la cuticule. Dans les couches plus intérieures, la cutine est peu abondante, ainsi que les autres corps accessoires, et la pectine et la cellulose apparaissent facilement. Dans la lame la plus interne, la cellulose seule existe.

« Chez une seconde série de végétaux terrestres, qui se réunit à la première par de nombreux intermédiaires, la cutinisation a envahi presque toute la membrane externe. Cependant, on distingue toujours une épicuticule qui a la même constitution que dans les groupes précédents. Dans la cuticule sont masquées non seulement les réactions des composés pectiques, mais encore celles des aldéhydes et des corps azotés, et on ne retrouve ces mêmes réactions que dans une mince zone située au contact de la lame de bordure interne. Cette zone peut être assimilée aux couches cuticulaires très réduites dans le cas présent. »

En 1911, CHODAT (18) disait : « On appelle cutine une excrétion qui se localise souvent à la périphérie des membranes qu'elle recouvre parfois comme d'un vernis. Cette substance, de nature chimique encore inconnue, résiste parfois fortement à l'action des acides; mais elle est ordinairement dissoute par la potasse bouillante. Elle donne, avec la chrysoïdine, une teinte jaune doré, alors que la subérine, avec laquelle elle a été souvent confondue, reste incolore par ce réactif. Elle incruste parfois la paroi dans toute son épaisseur; mais, le plus souvent, la cutine se dépose à la surface des membranes où elle forme une pellicule plus ou

(18) R. CHODAT. — *Principes de Botanique*, p. 176. (Baillièrre et fils, éditeurs, Paris, 1911.)

moins épaisse : la cuticule. On a remarqué que cette excrétion se fait ordinairement à la surface des cellules qui aboutissent vers l'extérieur de la plante, c'est-à-dire vers l'atmosphère externe, ou qui bordent les lacunes (*Nymphæa*). »

En 1913, R. MIRANDE (19) signale, parmi les substances incrustantes en même temps que l'hadromal et le sphagnol de CZAPECK (20), la subérine et la cutine ou cutose de FRÉMY (21). Puis, il signale le mode de recherches qu'il a employé pour déceler la « cutine » dans les membranes de *Caulerpa*, c'est-à-dire sa transformation sous l'action de la potasse en mycosine ou chitosane qui se colore en violet rouge par l'iode (22).

En 1924, BEATRICE LEE et H. PRIESTLEY (23) font paraître un travail des plus intéressants concernant la cuticule dont nous donnons ici la traduction *in-extenso* des conclusions :

« Le développement, la structure et la distribution de la cuticule est étudiée du point de vue que les graisses émigrant des cellules des tissus externes comme des tissus internes peuvent se fixer sur les membranes durant leur différenciation, et, en particulier, le long de la paroi externe où ces corps gras contribuent à former la cuticule.

« Microchimiquement, la cuticule est caractérisée par sa capacité de coloration avec les réactifs des graisses, sa grande résistance aux agents hydrolysants acides et son oxydation par les agents oxydants alcalins ou acides.

« La cuticule forme une couche continue à l'extérieur de

(19) R. MIRANDE. — Recherches sur la composition chimique de la membrane et le morcellement du thalle chez les Siphonales. (*Ann. Sciences Nat. Bot.*, 9^e série, t. XVIII, p. 147, 1913.)

(20) F. CZAPECK. — Über die sogenannten Ligninreaction der Holzer. (*Hoppe Seyler Z. f. Ph. Ch.*, t. XXVIII, 1899.)

— Sur quelques substances aromatiques (*Actes du Congrès international de Botanique*, p. 14, 1900.)

(21) FRÉMY. — *Loc. cit.*, p. 21 du présent travail.

(22) GILSON. — Recherches chimiques sur la membrane cellulaire des Champignons. (*La Cellule*, t. XI, p. 7, 1894.)

(23) BEATRICE LEE et J.-H. PRIESTLEY. — The Plant cuticle. (*Annals of Botany*, t. XXXVIII, p. 511, 1924.)

la paroi cellulosique de la cellule épidermique; au-dessous peut exister une zone sous-cuticulaire « cutinized lamellæ » imprégnée de dépôts gras.

« Le développement continu de la cuticule dans la tige des Angiospermes est décrit et met en évidence que la cuticule est épaissie par des corps gras émigrant le long des parois à partir des tissus internes. Son absence dans la racine est déterminée par des différences dans la structure de la paroi et le développement, déjà présente dans les points végétatifs de l'embryon et peu affectée par les conditions externes au cours de la germination.

« La mobilité des substances grasses dans les membranes peut être modifiée par les conditions du milieu, qui affectent ainsi l'épaississement de la cuticule en cours de formation. Cette thèse est soutenue par la référence à des cuticules sur des tiges feuillées auxquelles on fournit des rations variables de potassium ou de calcium.

« D'autre part, dans les plantes aquatiques, la présence d'une haute proportion de potassium par rapport au calcium produit une cuticule mince; car les savons solubles de potasse passent dans l'eau environnante.

« Lumière et humidité affectent l'épaisseur et la consistance de la cuticule par leur action sur l'oxydation et la condensation des acides gras, processus de la formation de la cuticule.

« La présence de la cuticule influe sur le degré d'évaporation de la plante et ainsi, indirectement, sur le degré de condensation subie par la paroi de cellulose sous-jacente. Cette considération apparaît jeter de la lumière sur l'« épiderme brun » des Fougères.

« La cuticule résultant d'une condensation chimique dans un air sec est très résistante aux forces d'étirement... »

En 1925 paraît encore un autre travail sur la même ques-

(24) BEATRICE LEE. — The Plant cuticle. (*Ann. of Botany*, t. XXXIX, p. 756, 1925.)

tion, mais, cette fois, de BEATRICE LEE (24) seulement. Voici, du reste, la traduction de ses conclusions :

« Cutine et subérine, bien que généralement similaires, montrent beaucoup de différences, parmi lesquelles l'absence dans la cutine d'acide phellonique et de glycerol.

« La cutine est une mixture complexe d'acides gras, à la fois libres et combinés avec des alcools, qui ont subi la condensation et l'oxydation; savons d'acides gras et matériel non saponifiable qui, probablement, contiennent quelques alcools supérieurs; substances résineuses et un composé dominant les réactions des tannins.

« Les quantités relatives de matériel non saponifiable, oxy-acides gras, et acides gras normaux, varient; mais il y a toujours une plus grande quantité totale d'oxy-acides gras que d'acides gras normaux.

« La prépondérance d'oxy-acides gras est le résultat de processus d'oxydation prenant place durant la formation de la cuticule. »

.....

Nous pourrions encore citer et analyser d'autres travaux ayant trait à la constitution de la cuticule et des zones sous-cuticulaires; mais nous préférons nous en tenir à ceux que nous venons de citer, parce que se rapportant plus particulièrement à nos recherches. Et puis ceci ne nous avancerait pas à grand chose, car la cutine, malgré les remarquables recherches d'URBAIN et FRÉMY, est encore peut-être beaucoup moins connue que la subérine, dont elle se rapproche cependant à certains égards. Comme elle, en effet, les réactifs des graisses, tels que le Soudan III et le bleu d'Indophénol, la colorent. Comme elle encore, elle présente la réaction de VON HÖHNEL (25). Mais, malgré ces ressemblances, il y a lieu de ne pas les identifier. Car, si on se

(25) I. VON HÖHNEL. — Histochemische Untersuchungen über die Xylophilin und die Coniferin. (*Sitz. ber. d. Kais. Akad. d. Wiss. in Wien*, 76, 663, 1877.)

base, comme d'habitude, peut-être à tort, du reste, sur les colorants pour poser la diagnose chimique d'une membrane, les membranes cutinisées se coloreraient électivement par le Ziehl-Nelsen et les membranes subérifiées par la solution concentrée et alcoolique de chlorophylle, agissant à l'obscurité. Ce qui est troublant, en effet, c'est que les membranes qui sont d'habitude considérées comme cutinisées ne se comportent pas toutes de la même façon à l'égard des colorants. Et, à ce propos, nous partageons entièrement la manière de voir de GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL (26); comme eux, nous disons que de nombreux problèmes restent à résoudre à ce point de vue et que, seules, de nouvelles recherches, judicieusement conduites, peuvent nous éclairer sur l'origine et la constitution de la cutine.

Et quoiqu'il eut été intéressant pour nous de connaître la constitution intime et vraie de la membrane externe des cellules épidermiques (ce qui nous aurait permis d'étudier, *in-vitro*, le comportement de ces substances vis-à-vis des corps anticryptogamiques essayés), nous ferons comme si nous les connaissions. Et, au lieu d'étudier ce comportement pour chacun de ces corps, nous l'étudierons pour leur synthèse, c'est-à-dire pour la cuticule, la zone sous-cuticulaire et la zone celluloso-pectosique.

(26) A. GUILLIERMOND, G. MANGENOT et L. PLANTEFOL. — *Traité de Cytologie végétale*, p. 362, Paris, 1933.)

CHAPITRE II

Recherches personnelles. — Technique des recherches.

Pour nous rendre compte si, oui ou non, la cuticule naturelle est susceptible de fixer les sels métalliques et, en particulier, les sels de cuivre, nous avons eu recours à deux méthodes :

I. — La méthode de macération.

II. — La méthode d'imbibition.

I. — MÉTHODE DE MACÉRATION

La méthode de macération consistait à faire des coupes dans des feuilles et à les placer, pendant un temps plus ou moins long, dans une solution d'un sel de cuivre déterminé.

Ces coupes étaient ensuite lavées à l'eau distillée et traitées par une solution de ferrocyanure de potassium. Puis, examinées au microscope, on se rendait compte si la cuticule présentait la coloration rouge saumon qui caractérise, dans les mêmes conditions, les tissus celluloso-pectosiques.

A. — FEUILLES AGÉES

Cette méthode fut appliquée aux pétioles et aux limbes frais des feuilles âgées suivantes :

Nerium Oleander (Apocyna.).

Prunus Laurocerasus (Rosa.).

Peucedanum palustre (Ombell.).

Cyclamen europæum (Primula.)

Aucuba japonica (Corna.).

Ligustrum vulgare (Olea.).

<i>Akebia quinata</i> (Lardizabala.).	<i>Vitis riparia</i> (Ampelida.).
<i>Ilex aquifolium</i> (Ilicinées).	<i>Vitis Berlandieri</i> (Ampelida.).
<i>Laurus nobilis</i> (Laura.).	<i>Vitis monticola</i> (Ampelida.).
<i>Ficus elastica</i> (Morées).	<i>Vitis rupestris</i> (Ampelida.).
<i>Vitis æstivalis</i> (Ampelida.).	<i>Hedera Helix</i> (Aralia.).

Et, afin d'avoir une indication première sur notre sujet, nous avons soumis ces coupes, pendant une demi-heure, à l'action d'une solution de sulfate de cuivre à 2 %.

Dans tous les cas, il nous fut impossible de discerner la moindre trace de coloration rouge saumon dans la cuticule. Par contre, la zone celluloso-pectosique de la membrane externe des cellules épidermiques la présentait nettement, ainsi que tous les éléments celluloso-pectosiques de la coupe. Mais cette première indication méritait d'être plus fouillée. On était en droit de se demander, en effet, si la fixation du sulfate de cuivre par la cuticule de ces plantes n'était pas fonction de la durée de macération, de la constitution histologique de la membrane externe des cellules épidermiques, du traitement qu'on pouvait lui faire subir avant que d'effectuer la dite macération, de la nature des sels, etc., etc., etc. Et ceci nous amena à faire toute une série d'essais que nous allons maintenant résumer.

A) *Influence de la durée de la macération.*

De nouvelles séries de coupes furent faites dans les pétioles et les limbes des plantes précédentes, et chacune de ces coupes fut laissée à macérer dans une solution de sulfate de cuivre à 2 % pendant une, deux, quatre, huit, seize, trente-deux, soixante-quatre heures et même cent vingt-huit heures.

La réaction au ferrocyanure leur fut ensuite appliquée et, en aucun cas, il ne nous fut possible de discerner la moindre coloration de la cuticule. Nous en conclûmes que la fixation du sulfate de cuivre par celle-ci n'est pas fonction de la durée de son immersion dans la solution saline.

B) Influence de la concentration saline.

La série de recherches dont nous venons de résumer succinctement les résultats a été effectuée à l'aide d'une solution de sulfate de cuivre de concentration relativement faible. Il y avait donc lieu de voir si des solutions de concentration plus élevée ne provoqueraient pas, de la part de la cuticule, une rétention quelconque. Une nouvelle série d'expériences fut donc entreprise avec des solutions dont la concentration, de plus en plus élevée, variait entre 2 % et la saturation à la température ordinaire.

Mais, en aucun cas, et quel que fût le temps pendant lequel on faisait agir ces solutions, il ne nous fut permis de constater la coloration de la cuticule au contact du ferrocyanure de potassium.

Donc, encore ici, nous fûmes amené à conclure que la concentration de la solution saline est sans influence sur la fixation du sel par la cuticule.

c) Influence de l'eau de Javel.

Les coupes que nous avons étudiées jusqu'à ce moment avaient été placées, sitôt faites, dans les solutions salines. Elles y avaient donc été mises à l'état naturel, c'est-à-dire sans avoir subi l'action préalable de l'eau de Javel, qu'on a coutume de faire agir sur les coupes pour en détruire le contenu cellulaire et en mordancer les membranes avant que de faire agir sur elles les colorants électifs.

Aussi, pour nous rendre compte si l'hypochlorite pouvait, par une action plus ou moins longue, déterminer, à la température ordinaire, la fixation des sels de cuivre par la région cutinisée des membranes externes des cellules épidermiques, effectuâmes-nous de nouvelles coupes dans le pétiole et le limbe des plantes précédentes et dans un certain nombre d'autres. Puis, sitôt effectuées, ces coupes

furent placées dans l'eau de Javel, où chacune d'elles macéra pendant un temps plus ou moins long. Autrement dit, des coupes effectuées dans une plante donnée macérèrent l'une pendant cinq minutes, l'autre pendant dix minutes, l'autre encore pendant vingt minutes, et ainsi de suite jusqu'à soixante-douze minutes.

Après ces macérations, elles furent retirées de leur bain chloré, nettoyées à grande eau et immergées dans une solution de sulfate de cuivre. Lavées de nouveau à l'eau distillée, elles furent soumises au ferrocyanure de potassium. Observées ensuite au microscope, aucune d'entre elles ne montra la fixation du sulfate de cuivre par la région cutinisée.

Par conséquent, nous en conclûmes que l'action, même prolongée, de l'eau de Javel sur les membranes cutinisées est sans influence sur la fixation du sulfate de cuivre par celles-ci. Evidemment, il nous était facile de prévoir ce résultat, puisque MM. DEVAUX et BOUYGUES l'avaient déjà énoncé. Mais il était bon de le vérifier sur un grand nombre d'espèces végétales et mettre ainsi nettement en vedette son degré de généralité.

d) *Influence de la nature du sel.*

Nous avons vu, jusqu'ici, que ni la durée de macération, ni l'influence de la concentration saline, ni celle de l'eau de Javel, ne déterminaient la fixation du cuivre par la cuticule.

Il y avait donc lieu de rechercher si, en changeant de sel, il en serait encore ainsi.

Des coupes furent alors faites dans les pétioles et les limbes des plantes suivantes :

<i>Prunus Laurocerasus</i> (Rosa.).	<i>Eleagnus hortensis</i> (Eléagnées.).
<i>Buxus sempervirens</i> (Euphorbia.).	<i>Solanum tuberosum</i> (Solana.).
<i>Viburnum Tinus</i> (Caprifolia.).	<i>Ilex aquifolium</i> (Ilicinées).
<i>Sambucus racemosa</i> (Caprifolia)	<i>Laurus nobilis</i> (Laura.).
	<i>Brassica napus</i> (Crucif.).

Rosa canina (Rosa.).

Quercus Suber (Cupulif.).

Salix cinerea (Salicinées).

Syringa vulgaris (Oléa.).

Hedera Helix (Aralia.).

Aucuba japonica (Corna.).

Vitis vinifera var. Semillon,

Sauvignon, Malbec, Othello

(Ampelidacées).

Ces coupes furent traitées par la méthode précédente. Et, tour à tour, le chlorure, l'acétate, l'oléate, le margarate, le stéarate, le résinate de cuivre furent essayés à la concentration de 2 % et aussi à des concentrations plus élevées. Or, en aucun cas, il ne nous fut possible de décèler, au microscope, sous l'influence du réactif en usage, la moindre trace de cuivre dans la partie cutinisée de la membrane.

E) Influence de la température.

Toutes les recherches que nous venons de résumer avaient été effectuées, jusqu'ici, à la température ordinaire. Aussi nous étions en droit de nous demander si, à des températures plus élevées, nous n'obtiendrions pas la fixation du cuivre par la région cutinisée de la membrane.

De nouvelles coupes furent alors faites dans les pétioles de feuilles de vigne déjà expérimentées, dans ceux de *Ficus elastica* (Morées), *Prunus Lauro-cerasus* (Rosa.), *Laurus nobilis* (Laura.), *Aucuba japonica* (Corna.), *Evonymus japonica* (Célastrinées), *Rhododendron arboreum* (Ericinées), etc., etc. On en fit plusieurs lots et chaque lot fut mis à macérer, dans une solution d'un des sels de cuivre précédents, contenue elle-même dans un tube à essai. Elle fut ainsi maintenue à 70°, pendant trois heures, au bain-marie. Puis, au bout de ce temps, les coupes de chaque lot furent retirées, fortement lavées et soumises à l'action du ferrocyanure de potassium.

Examinées ensuite une à une au microscope, il nous fut absolument impossible de décèler la moindre trace de cuivre dans la région cutinisée.

Il résulte de ces nouvelles recherches qu'une température

relativement élevée, qui n'est jamais atteinte dans la nature, est sans action sur la fixation des sels métalliques par les parois cellulaires.

B). — FEUILLES JEUNES

Après avoir étudié l'action des sels de cuivre sur la cuticule de feuilles âgées, il était logique de refaire les mêmes recherches pour la cuticule de feuilles jeunes. Mais, avant, il y avait lieu de nettement déterminer le sens exact que nous entendions donner au mot jeune. Les feuilles d'un âge très jeune sont, en effet, localisées dans les bourgeons. De sorte que si on sectionne transversalement ceux-ci en série, on obtient des coupes minces de limbes d'autant plus jeunes qu'on s'adresse à des feuilles de plus en plus éloignées de la périphérie du bourgeon. Or, si les expériences faites avec de telles feuilles pouvaient avoir, au point de vue scientifique pur, une importance très grande, par contre, au point de vue où nous nous étions placé, dès le début de nos études, les recherches faites sur ces feuilles perdaient de leur importance : l'infection cryptogamique n'ayant de chance de s'opérer, en effet, que lorsque les limbes sont sortis du bourgeon et ont acquis une certaine surface.

Nous avons donc effectué de nouveau tous les essais sur des séries de feuilles de *Sémillon*, *Sauvignon* et *Muscadelle* dont les premiers termes étaient constitués par les premiers limbes apparaissant après le « débourrage » des bourgeons et dont le dernier terme était représenté par des feuilles n'ayant pas encore totalement achevé leur croissance.

Or, en aucun cas, il ne nous fut possible de reconnaître la moindre fixation de cuivre par la cuticule.

CONCLUSIONS

Les recherches que nous venons d'exposer et que nous

avons effectuées sur la cuticule naturelle de feuilles jeunes et âgées nous permettent de dire :

1° Que cette région ne fixe pas les sels métalliques essayés;

2° Que cette non-fixation est indépendante de la durée de macération, de la concentration saline, de l'influence de l'eau de Javel et de celle de la température; qu'elle est indépendante enfin de la nature du sel.

II. — MÉTHODE D'IMBIBITION

Nous venons de voir que les recherches effectuées par la méthode de macération nous avaient donné des résultats négatifs quant à la fixation des sels de cuivre par la cuticule, alors que cette région s'était trouvée à tout instant dans des conditions on ne peut plus favorables pour s'imprégner, puisque les diverses parties histologiques de la membrane externe des cellules épidermiques avaient toujours été en contact intime, constant, simultané et, d'une manière uniforme, avec la solution cuprique. Il pouvait donc, *a priori*, paraître inutile d'avoir recours à la méthode d'imbibition pour être définitivement fixé sur la rétention des sels de cuivre par la cuticule.

Cependant, si toutes les recherches précédentes eussent suffi à fixer notre opinion sur ce point, elles ne nous permettaient pas de nous rendre compte si la cuticule se laissait traverser par les sels de cuivre sans les retenir. Il peut très bien se faire, en effet, que, grâce au pouvoir énorme de condensation de la région celluloso-pectosique des membranes externes des cellules épidermiques à l'égard des solutions salines et des sels de cuivre en particulier, il peut très bien se faire, disons-nous, qu'il s'établisse un courant de la solution expérimentée allant de l'extérieur vers l'intérieur, traversant ainsi la cuticule et la zone sous-cuticulaire pour s'arrêter ensuite à la zone celluloso-pectosique. Celle-ci

condenserait alors peu à peu, sur elle, de la substance métallique et ne céderait de cette substance aux membranes voisines, de même nature, qu'après avoir atteint elle-même un certain degré de saturation. Dans ces conditions, la cuticule jouerait simplement le rôle d'un filtre dépourvu de tout pouvoir condensant vis-à-vis de la dite liqueur. Et

comme ses espaces intermoléculaires sont infiniment étroits et que son histochimie est essentiellement réfractaire à toute condensation, il s'en suivrait que la solution saline ne saurait être rendue visible dans sa masse par le réactif approprié, puisque celle-ci dépourvue de pouvoir condensant. Autrement dit, la cuticule pourrait laisser passer la solution cuprique, mais sans la retenir, sans la fixer, soit par formation d'un produit nouveau, soit encore par simple adsorption. Et c'est pour nous faire une opinion sur ce point que nous avons entrepris de nouvelles expériences en usant de la méthode d'imbibition.

Cette méthode consistait à choisir sur une plante une feuille indemne le plus possible de toute blessure. Cette

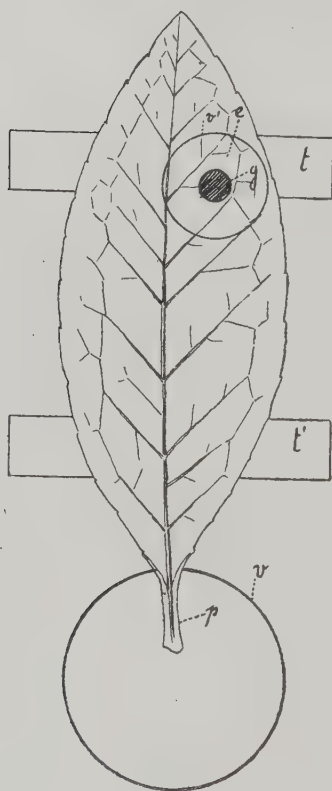


FIG. 2.

Schéma montrant le dispositif spécial adopté par nous.

feuille était ensuite détachée avec de très grandes précautions, surtout si elle présentait des poils, et manipulée de même dans la suite, de manière à ne pas provoquer des brisures dans ses dépendances épidermiques. Une fois dans le laboratoire, son pétiole (*p*) était rafraîchi à son extrémité

et plongé dans un peu d'eau contenue dans un verre de montre (v), tandis que son limbe reposait sur deux taquets (t et t').

Sur ce limbe, on choisissait encore un petit espace (e) indemne de toute blessure et on y déposait une goutte (g) de la solution saline qu'on voulait expérimenter. On laissait cette goutte, qu'on recouvrait d'un verre de montre (v'), au contact du limbe pendant un certain temps. On l'enlevait ensuite à l'aide d'un lavage à l'eau. On effectuait des coupes transversales dans cette surface, puis on faisait agir sur elles le ferrocyanure de potassium. On se rendait compte enfin si la coloration rouge saumon existait dans la cuticule.

A. — FEUILLES ADULTES

Pour ce qui est des feuilles adultes, on expérimenta tour à tour :

- a) Sur des limbes à cuticule épaisse et sans stomates à la face supérieure;
- b) Sur des limbes à cuticule mince et sans stomates à la face supérieure;
- c) Enfin sur des limbes avec stomates à la face supérieure du limbe.

Voici maintenant quelques détails complémentaires sur ces diverses recherches, ainsi que les résultats obtenus avec chacune d'elles.

A) *Feuilles sans stomates à la face supérieure du limbe et à cuticule épaisse.*

C'est une feuille de *Prunus Laurocerasus* (Rosa.) qui fut expérimentée tout d'abord.

Elle fut mise en expérience le 3 mai 1931, à 10 heures du matin.

Le 4 mai, à 8 heures, la feuille présentait sa coloration normale. Pas trace de ce changement de couleur que n'eut certes point manqué de produire la solution de sulfate de cuivre dans le parenchyme chlorophyllien, si elle y eût pénétré.

Le 5 mai, à 2 heures, la feuille était débarrassée de sa goutte. L'endroit où celle-ci avait reposé était regardé par transparence et rien d'anormal ne put être décelé à l'intérieur du tissu palissadique.

Donc, après quarante-huit heures de contact avec la solution de sulfate de cuivre, la cuticule était restée réfractaire à toute pénétration. Du reste, les coupes faites dans cet endroit et traitées au ferrocyanure ne permirent de voir aucune trace de cuivre dans la région cutinisée des cellules épidermiques.

Quant à la zone celluloso-pectosique, elle non plus ne laissait discerner aucune trace de cuivre. On pouvait donc affirmer que la cuticule ne se laisse pas traverser par la solution de sulfate de cuivre, même après quarante-huit heures et cent vingt heures de contact avec elle.

Les mêmes recherches furent faites avec *Ilex aquifolium* (Ilicinées). On put constater encore ici que, après soixante-sept heures de contact, la cuticule était restée imperméable et la zone celluloso-pectosique incolore.

Des résultats identiques furent ensuite obtenus avec *Aucuba japonica* (Corna.), *Ficus elastica* (Morées), *Hedera Helix* (Aralia.), *Laurus nobilis* (Laura.), *Ligustrum nepalense* (Oléa.).

B) *Feuilles sans stomates à la face supérieure du limbe et à cuticule mince.*

Après avoir expérimenté avec les feuilles précédentes, il était rationnel de s'adresser à des limbes à cuticule mince. Ce furent des limbes de *Vitis vinifera*, var. Semillon, Sauvignon, Malbec (Ampelida.), qui nous servirent tout d'abord

de sujets de recherches. Leurs feuilles, en effet, ne présentent pas de stomates à la face supérieure et leur cuticule est mince.

Or, après une heure, deux heures, quatre heures, huit heures, seize heures... cent vingt heures de contact avec une goutte de sulfate de cuivre, le parenchyme foliaire ne présentait aucune trace de brûlure. De plus, des coupes faites dans cette même région ne permirent pas de déceler du cuivre dans la zone cutinisée, pas plus que dans la zone celluloso-pectosique des membranes externes de l'épiderme.

Ces expériences furent ensuite renouvelées avec *Symphoricarpos racemosus* (Caprifolia.), *Prunus domestica* (Rosa.), etc., etc., et les résultats restèrent les mêmes.

c) Feuilles avec stomates à la face supérieure du limbe.

Après avoir expérimenté sur des feuilles sans stomates à la face supérieure du limbe, il y avait lieu de voir ce qui se passerait avec des feuilles en possédant. Dans cette intention, nous prîmes tout d'abord à ce sujet un limbe de *Malva sylvestris* (Malva.). Celui-ci possède, en effet, une cuticule mince. De plus, sa surface supérieure présente des stomates et des poils protecteurs.

Toutes les précautions furent prises pour ne pas blesser les poils et, partant, éliminer toute cause d'erreur. Puis, on déposa une goutte (g) de solution de sulfate de cuivre sur un endroit indemne, autant que faire se peut, de toute blessure et on mit la feuille en observation (fig. 3).

Au bout d'une heure, le parenchyme chlorophyllien de celle-ci ne présentait aucun changement.

Au bout de deux heures, il n'y eut pas de changement encore.

Au bout de quatre heures, de même.

Au bout de huit heures, le limbe était toujours intact.

Au bout de seize heures, pas de changement non plus.

Mais, au bout de vingt-quatre heures, les choses changè-

rent. En effet, le limbe présentait sur la face supérieure, aux endroits où la goutte avait séjourné, un certain nombre de petits points, de couleur foncée (fig. 4, *p*). En examinant ensuite avec soin, au microscope, ces points, on constatait que chacune de ces taches correspondait à l'ouverture d'un

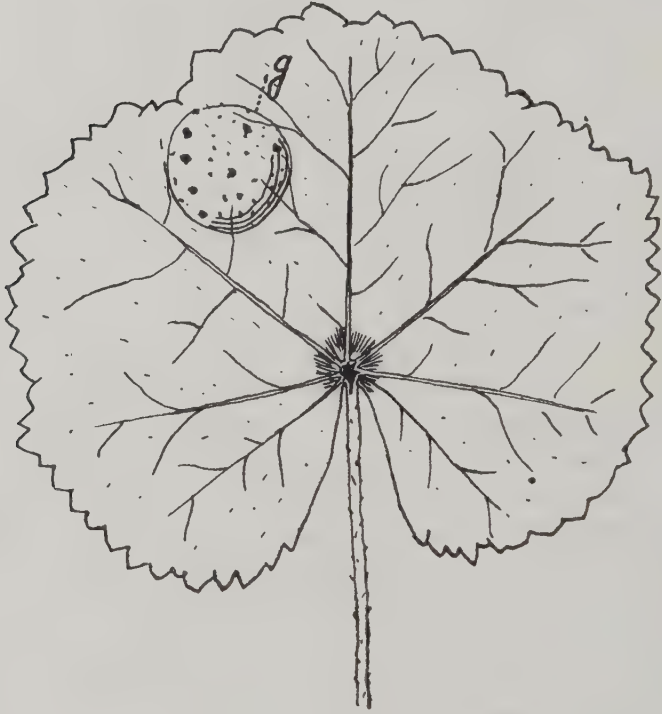


FIG. 3.

Malva sylvestris après vingt-quatre heures de contact avec la solution de sulfate de cuivre.

stomate. Mais ces taches étaient relativement peu nombreuses par rapport au nombre de stomates. Pas mal d'entre eux, en effet, s'étaient montrés réfractaires à tout passage de la solution, même après vingt-quatre heures.

Une fois ces observations faites, la feuille fut soigneusement lavée, avec de l'eau distillée sur verre, et on effectua



FIG. 4.

Feuille de *Malva sylvestris* dont certains stomates *p, p*, ont laissé pénétrer la solution.

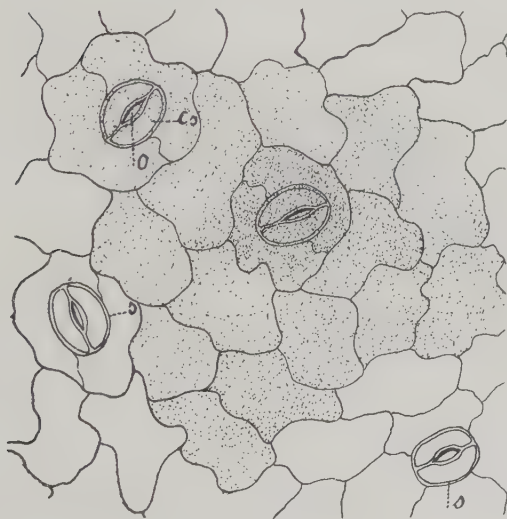


FIG. 5.

Même chose que précédemment mais avec coalescence des plages nécrosées.

des coupes dans la région des taches. Puis on les traita par la solution de ferrocyanure de potassium. On observa, dans ces conditions, que, sous ces taches, le tissu parenchymateux foliaire était coloré en rouge saumon. Mais cette coloration n'occupait que quelques cellules environnant directement les stomates. Quant à la cuticule, elle ne présenta aucune coloration.

Après ce premier résultat, d'autres feuilles de *Malva sylvestris* (Malva.) furent expérimentées pendant cent trente heures. A la suite de ce long contact, les petites taches glauques étaient plus nombreuses et celles de quelques feuilles de l'expérience précédente, qu'on avait conservées pour les suivre, étaient bien plus étendues et, le plus souvent, coalescentes entre elles (fig. 5). Cependant, au microscope, on observait toujours des stomates (s) n'ayant pas été traversés par la solution. Puis le limbe, vu en coupe transversale et traité par la solution de ferrocyanure de potassium, montrait que la surface occupée par la coloration rouge saumon s'était étendue en largeur et en profondeur, car on pouvait la remarquer jusqu'au voisinage du tissu lacuneux, voire même, sur certains points, jusqu'à l'épiderme inférieur. Toutefois, la cuticule n'apparut nulle part colorée en rouge saumon.

Les mêmes recherches furent encore effectuées avec *Phlomis samia* (Labiées), dont les limbes ont une cuticule très mince, une face supérieure remplie de stomates et des poils protecteurs et sécréteurs.

La feuille à expérimenter fut encore récoltée avec soin de manière à éviter des blessures dans les poils. Puis, après avoir recherché à la loupe un endroit aussi indemne que possible de toute blessure, on y déposa une goutte de solution de sulfate de cuivre.

Au bout d'une heure, deux heures, quatre heures, huit heures, seize heures, la feuille examinée se montra parfaitement intacte.

Mais au bout de vingt-quatre heures, elle présenta quel-

ques taches très fines, de couleur foncée, à l'endroit même où la goutte saline avait été déposée.

Examinées au microscope, ces taches correspondaient, les unes aux ouvertures des stomates, les autres à la base de poils sécréteurs qui avaient été involontairement traumatisés. Toutefois, ici encore, certains stomates ne s'étaient pas laissé pénétrer par la solution et la base de certains poils sécréteurs était, elle aussi, restée pour la même raison incolore.

En coupe transversale et après avoir fait agir la solution de ferrocyanure de potassium, on vit, au-dessous de chaque tache, les tissus celluloso-pectosiques colorés sous les stomates et poils sécréteurs qui s'étaient laissés pénétrer. Mais la cuticule ne présentait jamais la moindre tache de cuivre.

Les mêmes recherches furent encore poursuivies avec les feuilles des plantes suivantes qui, toutes, possèdent des stomates à la face supérieure :

<i>Ruta divaricata</i> (Ruta.).	<i>Bryocarpum hymalaicum</i> (Primula.).
<i>Tussilago Farfara</i> (Composées).	<i>Canna divaricata</i> (Scitaminées).
<i>Aubrietia deltoideum</i> (Crucif.).	<i>Canna zebrina</i> (Scitaminées).
<i>Baccharis halimifolia</i> (Comp.).	<i>Lycium barbarum</i> (Solana.).
<i>Asarum europaeum</i> (Aristolochiées).	<i>Syringa vulgaris</i> (Oléa.).
<i>Boltonia glastifolia</i> (Composées).	<i>Faba vulgaris</i> (Papilion.).
<i>Lysimachia vulgaris</i> (Primula.).	<i>Primula viscosa</i> (Primula.).
<i>Omphalodes linifolia</i> (Borraginées).	<i>Borrago officinalis</i> (Borraginées).
<i>Helianthus annuus</i> (Composées).	<i>Pisum sativum</i> (Papilion.).
<i>Hibiscus syriacus</i> (Malva.).	<i>Plantago major</i> (Plantaginées).

Dans tous les cas, la cuticule ne présentait aucune fixation de cuivre.

Ces mêmes expériences furent réalisées aussi avec l'azotate, le chlorure, l'acétate de cuivre, etc., etc., et les résultats furent toujours les mêmes.

B. — FEUILLES JEUNES.

Après avoir expérimenté sur des feuilles adultes, nous avons effectué les mêmes recherches sur des feuilles jeunes. Il nous paraissait de toute première importance, en effet, de savoir si la cuticule d'un âge bien plus jeune ne fixait pas les sels de cuivre et ne se prêtait pas mieux aussi au passage de leurs solutions. Toutefois, afin de pouvoir établir des comparaisons plus nettes, nous avons simultanément expérimenté, pour chaque espèce étudiée, sur une de ses feuilles fort jeunes et sur une de ses feuilles adultes. Or, parmi les espèces qui servirent à ces nouvelles recherches, nous citerons :

<i>Prunus Laurocerasus</i> (Rosa.).	<i>Eleagnus hortensis</i> (Eléagnées).
<i>Ligustrum nepalense</i> (Oléa.).	<i>Brassica napus</i> (Crucif.).
<i>Ilex aquifolium</i> (Ilicinées).	<i>Aucuba japonica</i> (Corna.).
<i>Viburnum Tinus</i> (Caprifolia.).	<i>Ficus elastica</i> (Morées).
<i>Euphorbia amygdaloides</i> (Euphorbia.).	<i>Phlomis samia</i> (Labiées).
<i>Euphorbia Lathyris</i> (Euphorbia.).	<i>Potentilla verna</i> (Rosa.).
<i>Saxifraga trifurcata</i> (Saxifraga.).	<i>Rosa canina</i> (Rosa.).
<i>Ruscus racemosus</i> (Lilia.).	<i>Hedera Helix</i> (Aralia.).
<i>Akebia quinata</i> (Lardizabala.).	<i>Nerium Oleander</i> (Apocyna.).
<i>Vitis riparia</i> et autres (Ampélida.).	<i>Taxus baccata</i> (Taxinées).
<i>Vitis rupestris</i> (Ampélida.).	<i>Petasites vulgaris</i> (Composées).
	<i>Quercus Suber</i> (Cupulif.).
	<i>Laurus nobilis</i> (Laur.).

On essaya tour à tour le sulfate, l'azotate, le chlorure, l'acétate de cuivre, etc., etc., à des concentrations variant de 2 à 10 %.

Les résultats qu'on obtint furent les mêmes pour toutes les plantes citées plus haut. Voici, du reste, au hasard, quelques exemples :

A) *Feuilles jeunes sans stomates à la face supérieure
du limbe et à cuticule épaisse.*

Prunus Laurocerasus (Rosa.). — Après vingt-quatre heures, les trois feuilles étaient saines et ne présentaient aucune tache glauque. De même après soixante-douze heures. De plus, les coupes faites à ce moment dans la région foliaire, où les gouttes avaient séjourné, ne permirent nullement de déceler le cuivre dans la cuticule.

B) *Feuilles jeunes sans stomates à la face supérieure
du limbe et à cuticule mince.*

Vitis riparia, Semillon, Sauvignon, Muscadelle. — Après deux, quatre, huit, seize, vingt-quatre heures ? Rien ! Après cent trente-cinq heures ? Encore rien ! Les feuilles étaient parfaitement intactes, sans trace de tache glauque dans le parenchyme foliaire. Encore ici des coupes effectuées dans la région d'imbibition ne révélèrent rien dans la cuticule.

c) *Feuilles jeunes avec stomates à la face supérieure
du limbe.*

Brassica napus (Crucif.). — Cette feuille présente des stomates à la face supérieure. Deux feuilles, une jeune, une autre très âgée furent choisies.

Au bout d'une heure, de deux heures, de quatre heures ? Absence de taches glauques dans le parenchyme.

Au bout de vingt-quatre heures, la plus jeune était déjà un peu tachetée. Toutefois, la plus âgée ne l'était pas encore.

Mais, au bout de trente-six heures, celle-ci possédait quelques taches. Et, après quarante-huit heures, le limbe était sérieusement attaqué. Quant à la plus jeune, les taches, à ce moment-là, étaient déjà fusionnées et affectaient la forme d'une grande tache unique de couleur foncée.

Enfin, les coupes faites dans ces régions ne révélèrent rien d'anormal dans la cuticule.

Les feuilles de *Brassica napus* que nous avons étudiées possèdent, en plus de nombreux stomates sur leur face supérieure, un revêtement cireux des plus importants, puisque les gouttes d'eau qui tombent sur sa surface y roulent dans tous les sens. Or, on pouvait se demander si ce revêtement cireux ne serait pas capable de jouer quelque rôle dans la pénétration de la solution saline à l'intérieur du parenchyme foliaire ou bien, au contraire, si les stomates seraient seuls les sièges de cette pénétration.

Nous fûmes ainsi amené à effectuer cette nouvelle recherche en songeant à la facilité avec laquelle le sulfate de cuivre s'allie aux résines et, en particulier, à la résine de *Pinus maritima* ou de *Pinus sylvestris*. Nous n'en voulons pour preuve que les larmes du résinate de cuivre qu'on aperçoit, très fréquemment, à la surface des poteaux télégraphiques dont l'aubier a été injecté avec une solution de ce sel. Or, nous savons la parenté qui existe entre les résines et les cires. Il était donc normal de penser que celles-ci pourraient bien se comporter comme celles-là vis-à-vis du sulfate de cuivre et autres sels métalliques. C'est pourquoi une feuille d'*Euphorbia Lathyris* (*Euphorbia*.), laquelle est absolument dépourvue de stomates à la face supérieure, mais y possède un fort revêtement cireux, fut prélevée et manipulée avec un très grand soin. Il s'agissait, en effet, de ne pas toucher à cette face supérieure. Puis une goutte de sulfate de cuivre fut déposée à un endroit indemne de toute solution de continuité.

Or, après une, deux, quatre, huit, seize heures de contact, la feuille ne présenta, par transparence, dans son parenchyme, aucune tache de couleur vert glauque, laquelle couleur est, comme on sait déjà, l'indice infaillible de la pénétration du sulfate de cuivre dans le tissu parenchymateux du limbe.

De plus, des coupes faites dans la région foliaire sur

laquelle avait été déposée la goutte de sulfate de cuivre, ne permirent de déceler aucune coloration de la cuticule après son traitement par le ferrocyanure. Il en fut de même pour la zone celluloso-pectosique.

CONCLUSIONS

Il résulte de nos recherches que la cuticule des feuilles âgées et jeunes est réfractaire à la pénétration des sels de cuivre, et ce, quelle que soit l'importance du revêtement cireux présenté par ces feuilles. Seules les feuilles possédant des stomates à la face supérieure du limbe se laissent imbiber. Dans ce cas, les ostioles servent de porte d'entrée aux liquides cupriques et, encore, cette entrée est-elle subordonnée à son tour à l'influence des causes extérieures et à leur variation.

Autres portes d'entrée des solutions salines à l'intérieur du limbe.

Les recherches précédentes nous ont montré que la zone cutinisée de la face supérieure des limbes ne permet pas le passage des solutions salines, pas plus qu'elle n'assure leur fixation. Elles nous ont encore appris que la face supérieure des feuilles ne laisse passer les dits liquides que si elle possède des stomates et, dans ces conditions, c'est uniquement les ostioles qui jouent ce rôle capital.

Or, il nous a paru intéressant de rechercher dans quelle mesure les blessures faites artificiellement sur la face supérieure d'un limbe pouvaient faciliter et assurer la pénétration des sels métalliques dans celui-ci. En effet, lorsqu'on parcourt les pays de vignobles, ainsi que nous l'avons fait dans le Médoc, le Sauternais et le pays de Sainte-Croix-du-Mont, il n'est pas rare d'entendre les viticulteurs se plaindre des brûlures provoquées sur les feuilles par l'application

de bouillies bordelaises dont l'eau donne encore, sous l'action de AzH_3 , la réaction caractéristique bleue de l'eau céleste. Cependant, les feuilles de vigne (*Sauvignon*, *Sémillon*, *Muscadelle*, etc...) ne possèdent pas de stomates à la face supérieure du limbe; par conséquent, la pénétration ne doit se faire que par des solutions de continuité intéressant plus ou moins profondément les régions cuticulaires des limbes. C'est pour démontrer qu'il en est certainement ainsi que nous avons entrepris toute une série d'expériences sur des limbes dépourvus entièrement de stomates à la face supérieure et traumatisés, soit très légèrement, soit légèrement, soit très fortement.

Pour effectuer ce traumatisme, nous nous sommes servi d'une aiguille à coudre très fine montée au sommet d'un porte-plume en bois, et, à l'aide de cet instrument plutôt primitif, nous avons rayé, d'une manière essentiellement légère, un endroit (*a*) de la face supérieure d'une feuille de *Prunus Laurocerasus* (Rosa.) (fig. 6). Sur un autre endroit de cette même surface, nous avons fait une rayure plus profonde (*b*), et, enfin, sur un autre point encore (*c*), nous avons nettement pénétré jusque dans le parenchyme palissadique. Nous avons alors déposé sur un point donné de ces diverses rayures, une goutte (*g*) de SO_4Cu . Nous avons recouvert chaque goutte avec un petit verre de montre (*v*) pour empêcher toute évaporation, et voici ce dont nous nous sommes aperçu au bout d'un certain temps.

Mise en marche de l'expérience le 2 juillet 1933, à 10 h. 05.

A 10 h. 08 : la forte rayure apparaît nettement sous la goutte de SO_4Cu par suite de la pénétration de celui-ci entre ses lèvres. Au contraire, rien n'apparaît pour la fine ni la très fine rayure.

A 14 h. 40 : rien de nouveau sur les blessures extrêmement fine et fine; au contraire, la blessure forte est encore plus nette.

A 18 h. 45 : rien de nouveau sur les blessures extrêmement fine et fine. Par contre, la blessure profonde est encore

rendue plus nette par le passage de la solution cuprique entre ses lèvres et son étalement au-dessous des éléments épidermiques.

Le 10 juillet, à 8 h. 20, c'est-à-dire vingt heures environ après la mise en marche de l'expérience, rien de nouveau

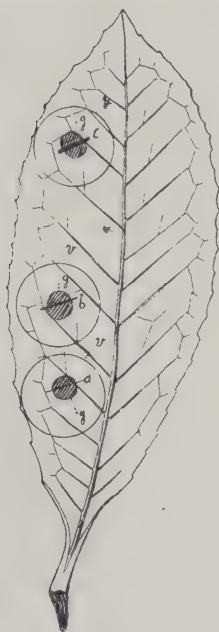


FIG. 6.

- a, Blessure excessivement légère ;
- b, Blessure plus profonde ;
- c, Blessure très profonde.



FIG. 7.

Même chose que précédemment ; mais coalescence énorme des plages atteintes.

pour les blessures extrêmement fine et fine. Mais la blessure profonde ressort encore mieux et l'envahissement du parenchyme chlorophyllien est des plus étendu. La figure 7 donne une idée de la progression croissante de cet envahissement (e).

L'expérience précédente fut répétée avec *Aucuba japonica* (Corna.), *Laurus nobilis* (Laura.), *Hedera Helix* (Ara-

lia.), *Quercus Suber* (Cupulif.), *Ligustrum nepalense* (Oléa.), *Euphorbia amygdaloides* (Euphorbia.), *Eleagnus hortensis* (Eléagnées), *Lonicera caprifolium* (Caprifolia.), *Vitis vinifera*, var. Semillon, Jacquez, *riparia* (Gloire de Montpellier), *Noah* (Ampelida.), et, dans tous les cas, nous obtînmes les mêmes résultats.

Nous essayâmes encore, sur ces mêmes feuilles, l'azotate, le chlorure, l'oléate et l'acétate de cuivre, en solutions de concentration variée. Et, avec tous ces sels, les résultats furent encore les mêmes.

CONCLUSIONS

Il résulte de ces expériences on ne peut plus simples que, pour qu'il y ait altération du parenchyme chlorophyllien sous-jacent à la face supérieure du limbe, il est nécessaire que les blessures de la membrane externe des cellules épidermiques intéresse au moins toute sa région cutinisée. Si, en effet, l'épicuticule, la cuticule et la zone sous-cuticulaire sont seules traumatisées, les sels ne pénètrent pas à l'intérieur du parenchyme palissadique. Par contre, lorsque la blessure est profonde et intéresse toute la membrane, cette blessure devient une porte largement ouverte aux solutions métalliques, car elle joue, dans ce cas, le rôle de l'ostiole des stomates vis-à-vis de ces mêmes solutions. Or, de telles blessures peuvent exister naturellement à la face supérieure des limbes des feuilles de vigne où elles sont provoquées soit par l'action des grands vents, ou encore par certaines façons qu'on fait subir au cep de vigne ou même encore lorsque, avec le pulvérisateur, on dirige les jets de manière à atteindre les faces inférieures des limbes, lesquelles sont très riches en stomates; ou enfin par des érosions d'origine cryptogamique ou animale.

Rôle des acides dans la fixation du sulfate de cuivre par la cuticule.

A. — ACIDE SULFURIQUE

Nous avons vu plus haut que MILLARDET et GAYON, pour démontrer la fixation du cuivre par la cuticule, avaient préparé celle-ci par l'action de l'acide sulfurique monohydraté du commerce sur des feuilles de vigne préalablement découpées en petits morceaux. Nous avons vu, d'autre part, que la cuticule naturelle ne fixe pas le cuivre. Il était donc logique de rechercher si l'acide sulfurique employé par MILLARDET et GAYON ne provoquait pas justement cette fixation.

Pour résoudre cette question importante, nous avons institué une série de recherches des plus simples que nous allons résumer maintenant.

Des feuilles pétioleées, telles que celles de *Vitis vinifera*, var. Semillon, Sauvignon, Noah, Chasselas (Ampelida.), *Nerium oleander* (Apocy.), *Laurus nobilis* (Laura.), *Prunus Lauro-cerasus* (Rosa.), *Aucuba japonica* (Corna.), eurent leur pétiole placé dans une solution d'acide sulfurique du commerce à 5 %. Ces pétioles y séjournèrent pendant une durée de douze heures et, au bout de ce temps, ils furent retirés du bain. On put alors constater que la partie des pétioles qui avait subi la macération était d'une coloration plutôt brune et que les tissus s'étaient ramollis. Toutefois, on fit des coupes dans ces régions; et, après les avoir longuement lavées, on les mit à macérer dans une solution de sulfate de cuivre concentré. La durée d'immersion dans celle-ci fut encore de douze heures. Au bout de ce temps, on retira les coupes; on les lava à grande eau; on les traita par le ferrocyanure et on put alors observer au microscope que la cuticule était restée, dans tous les cas, indemne de toute trace de cuivre.

On reprit cette même expérience en prolongeant la durée de macération dans l'acide sulfurique pendant vingt-quatre heures et, au bout de ce temps encore, le résultat fut le même.

La méthode d'imbibition fut employée aussi à l'égard de l'acide sulfurique en solution à 5 %; et, ici encore, le résultat fut identique au précédent : même après des contacts de trente-six, quarante-huit et soixante-douze heures entre la goutte et le limbe. D'autres recherches du même genre furent effectuées avec des solutions de plus en plus concentrées; mais les résultats ne varièrent pas. Dans tous les cas, la cuticule resta indemne de toute trace de cuivre.

Enfin, pour en finir avec ces recherches, nous essayâmes l'azotate, le chlorure, l'acétate de cuivre après l'action de l'acide sulfurique. Et, encore ici, les résultats obtenus ne firent que confirmer les précédents : la cuticule ne retint pas le cuivre.

B. — ACIDE AZOTIQUE

Nous venons de voir que l'acide sulfurique est sans influence sur la cuticule en ce qui concerne la rétention des sels de cuivre par elle. Mais en serait-il de même pour un acide très fortement oxydant comme l'acide azotique, par exemple ? On sait, en effet, avec quelle aisance cet acide lâche son oxygène. Nous n'en voulons, du reste, pour preuve que sa facile décomposition sous l'influence de la lumière solaire, laquelle se manifeste par l'apparition de vapeurs nitreuses dans la partie libre du flacon contenant le dit acide. On sait, de plus, d'après les recherches de FRÉMY et URBAIN, que cet acide attaque facilement la cuticule (1).

Il nous a donc paru important d'essayer cet oxydant énergique et de refaire avec lui toute la gamme d'expé-

(1) Voir page 21 du présent travail.

riences que nous avons effectuées avec l'acide sulfurique.

Les feuilles qui servirent à ces nouvelles études appartenaient d'abord aux mêmes variétés de Vigne déjà étudiées, puis à :

<i>Ilex aquifolium</i> (Ilicinées).	<i>Sambucus racemosa</i> (Caprifol.).
<i>Nerium Oleander</i> (Apocyna.).	<i>Eleagnus hortensis</i> (Eléagnées).
<i>Euphorbia amygdaloides</i> (Euphorbia.).	<i>Ficus elastica</i> (Morées).
<i>Rhododendron ferrugineum</i> (Erica.).	<i>Corylus colurna</i> (Cupulif.).
<i>Pittosporum Tobira</i> (Pittosporées).	<i>Syringa vulgaris</i> (Oléa.).
<i>Nandina domestica</i> (Berberidées).	<i>Helianthus giganteus</i> (Composées).
<i>Eriobothrya japonica</i> (Rosa.).	<i>Pyrus baccata</i> (Rosa.).
	<i>Prunus japonica</i> (Rosa.).
	<i>Brassica napus</i> (Crucif.).
	<i>Buxus balearica</i> (Euphorbia.).

Et, comme résultat de ces nouvelles recherches, nous eûmes à enregistrer, comme pour l'acide sulfurique, le rôle négatif de l'acide azotique dans la fixation du cuivre par la cuticule, du moins à la température ordinaire, la seule qui nous intéressait.

CONCLUSIONS

Il résulte des recherches précédentes que, dans les expériences de MILLARDET et GAYON, lesquelles les ont amenés à conclure à la fixation du cuivre par la cuticule, l'acide sulfurique n'est pour rien dans cette fixation. Même l'acide azotique, qui est cependant l'acide le plus oxydant de tous, est sans influence, du moins à la température ordinaire : la seule, du reste, qui nous intéresse, puisque étant celle de la Nature.

Action des sels de cuivre de la « Bouillie bordelaise » sur la cuticule.

Ces sels sont-ils fixés par la cuticule ?

Grâce à toutes les recherches précédemment exposées, nous avons pu nous rendre compte que la région cutineuse de la membrane externe des cellules épidermiques ne présente aucune affinité à l'égard des sels de cuivre, puisque non seulement pas fixés par elle, mais encore parce que imperméable à ceux-ci.

Il eut donc été naturel d'étendre ces conclusions aux sels de cuivre qui prennent naissance au sein même de la bouillie bordelaise lors de sa préparation et qui s'y trouvent encore au moment de sa pulvérisation à la surface des feuilles. Cependant, nous avons pensé qu'il était plus rationnel de contrôler le fait. Et si, par suite du désaccord qui existe, même de nos jours (1), entre les auteurs, sur la nature de ces sels, nous n'avons pu songer à étudier leur action sur la cuticule, du moins pour chacun d'eux séparément, par contre, nous avons pu le faire pour leur ensemble. Car il faut bien savoir que, sitôt qu'il pleut sur les feuilles de vigne dûment sulfatées, l'eau qui en dégouline contient du cuivre (2) et, partant, les dits sels en solution.

Pour réaliser ces nouvelles recherches, nous nous sommes adressé à des *Riparia*, gloire de Montpellier, lesquelles n'avaient jamais reçu aucun sulfatage. Des coupes transversales furent effectuées dans le limbe et dans le pétiole, et celles-ci furent placées, sitôt faites, dans de l'eau

(1) PICKERING. — *Journal of the chemical Society*; déc. 1907, p. 1988.

L. SICARD. — *Etude de la composition et de la préparation de la bouillie bordelaise*, 1914. Montpellier, Coulet et fils, éditeurs.

L. RAVAZ. — *Le Mildiou, caractères, conditions de développement, traitement*, 1914. Paris, Masson et C^o, éditeurs.

G. VILLEDIEU. — Cuivre et Mildiou (*Bull. Sciences pharmacologiques*, t. XXXVIII, 33^e année, n^o 2, février 1931).

(2) Voir page 95 du présent travail.

recueillie pendant une pluie d'orage à l'extrémité des dents de feuille de Sémillon qui, elles, avaient été sulfatées plusieurs fois. Le traitement d'une partie de cette eau par de l'ammoniaque nous avait démontré, au préalable, l'existence du cuivre dans son sein. Après une macération prolongée de ces coupes dans cette eau de pluie, macération qui dura jusqu'à six jours, il nous fut impossible de reconnaître la présence du cuivre dans la cuticule. Par contre, la portion celluloso-pectosique de la membrane externe des cellules épidermiques l'avait fixé.

Comme on le voit, les sels de la bouillie bordelaise, dissous par l'eau de pluie, se comportèrent, à l'égard de la membrane externe des cellules épidermiques, comme les sels précédemment étudiés.

Ces sels sont-ils susceptibles d'altérer le parenchyme chlorophyllien ?

Mais ces mêmes sels, dans les conditions naturelles, sont-ils susceptibles de provoquer la nécrose cellulaire improprement appelée « brûlure », dont nous nous sommes déjà occupé plus haut ? Pour nous faire une opinion sur ce point délicat et d'importance, nous avons effectué une nouvelle série de recherches que nous allons exposer.

1^{re} Expérience. — Le 25 août 1931, des feuilles très copieusement sulfatées sont choisies sur des pieds de *Sauvignon*, dans un domaine de Sainte-Croix-du-Mont (3). Celles-ci sont mises à macérer dans de l'eau distillée sur verre pendant quarante-huit heures et retournées plusieurs fois dans leur bain. Au bout de ce temps, l'eau de macération est filtrée sur coton dans un entonnoir de verre et, à l'aide de quelques gouttes d'ammoniaque, on cherche à déceler dans un certain volume de cette eau la présence du cuivre. Le résultat est positif.

Une fois cette constatation faite, nous prenons des feuilles

(3) Domaine de Louqsor, appartenant à M. Débats.

de Jacquez qui n'ont jamais reçu trace de bouillie bordelaise. Puis nous faisons sur chacune d'elles, à l'aide d'une aiguille, des blessures (fig. 8) dont l'une est très superficielle (A), dont l'autre l'est moins (B), sans toutefois intéresser le parenchyme chlorophyllien, et dont la dernière, enfin (C), traverse celui-ci dans presque toute son épaisseur.

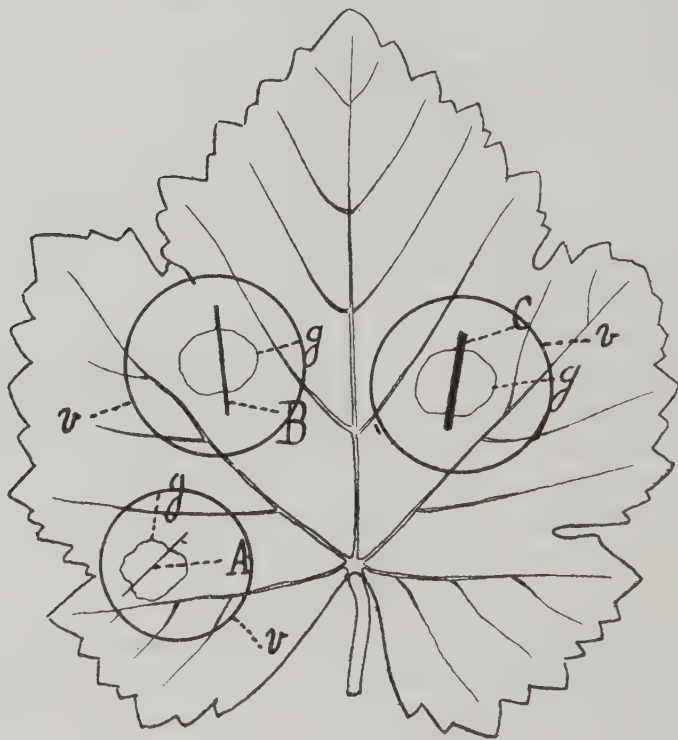


FIG. 8.

Une fois ces blessures faites, nous déposons sur chacune d'elles une grosse goutte de l'eau de macération. Nous recouvrons d'un petit verre de montre chaque goutte, pour éviter toute évaporation perturbatrice, et nous suivons les feuilles pendant un certain temps.

Les dessins ci-joints nous résument très nettement ce qui se passe .

La figure 8 représente un limbe à la face supérieure

duquel, le 6 septembre 1933, on a fait trois blessures A, B, C, dont nous venons de relater l'intensité. (*g*) est le contour de la goutte de liquide placé sur chaque blessure et la force du trait équivalent au degré de pénétration de la blessure. Enfin, (*v*) représente le contour du verre de montre.

La figure 9 représente la même feuille, mais deux heures

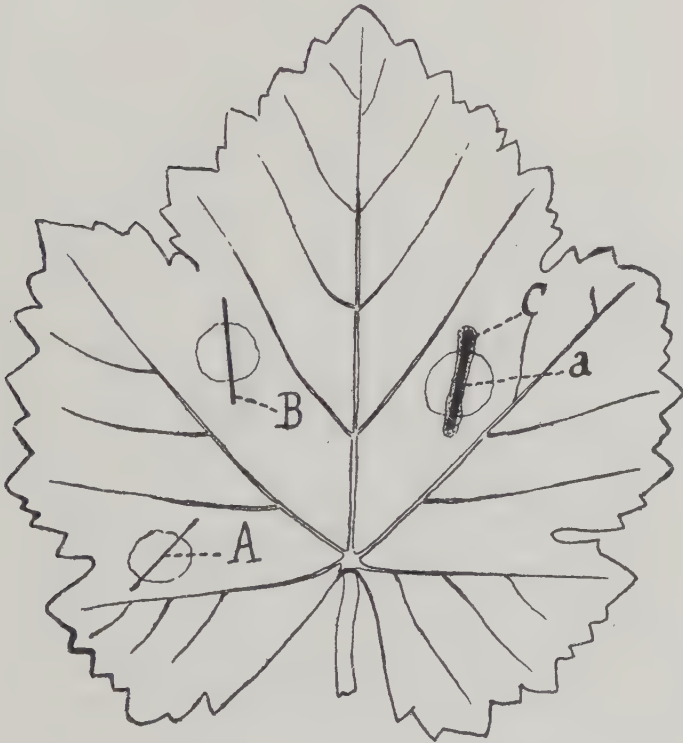


FIG. 9.

après l'application de la goutte (*g*). A ce moment, tandis que A et B ne présentent rien d'anormal, C, au contraire, laisse apercevoir, tout autour de la blessure, une auréole (*a*) qui épouse sa forme et qui correspond à l'attaque des cellules chlorophylliennes par les sels de cuivre de l'eau de macération.

La figure 10 représente encore la même feuille. A et B ne

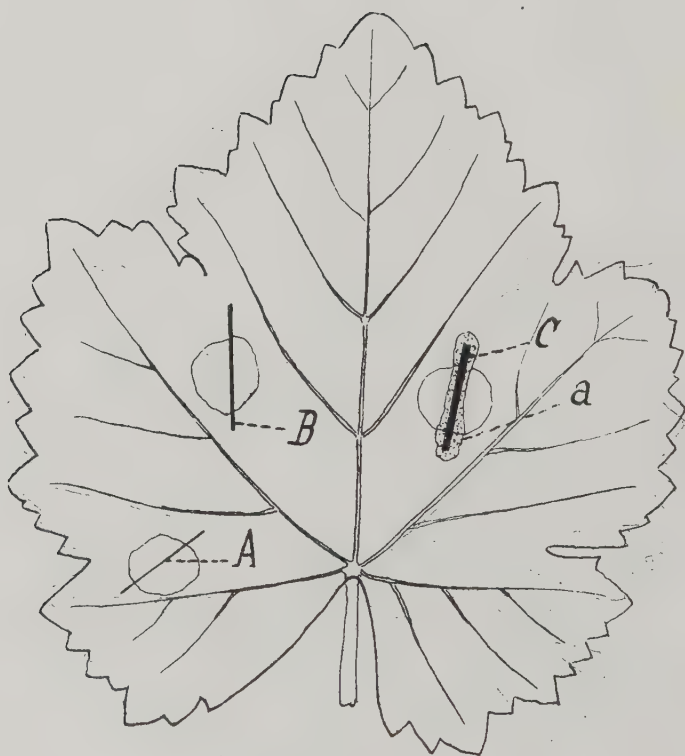


FIG. 10.

laissent rien voir d'anormal. Par contre, C présente une surface d'attaque (*a*) plus étendue.

La figure 11 est encore plus instructive; car, tandis que A et B ne possèdent rien, C, par contre, montre une aire d'attaque beaucoup plus prononcée, et ce au bout de deux jours.

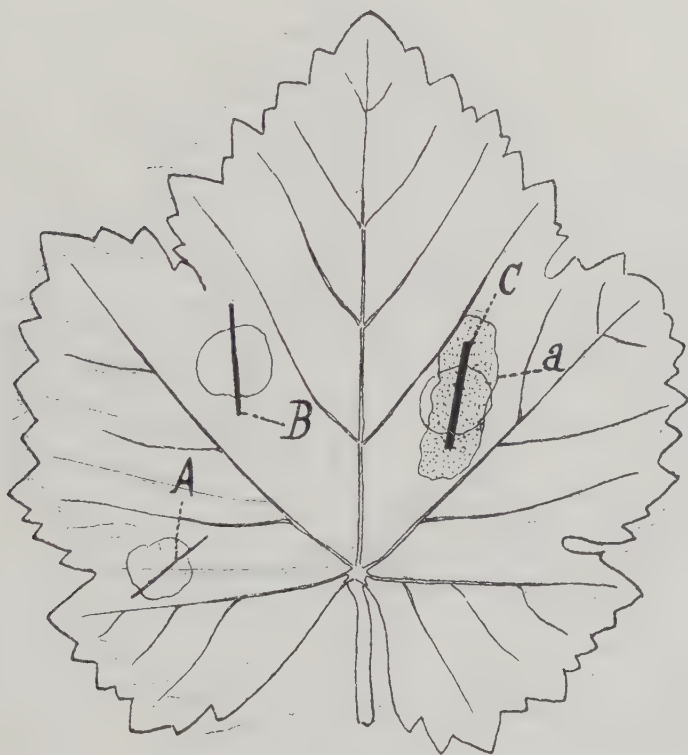


FIG. 11.

La figure 12 nous montre encore la même feuille après quatre jours. L'aire atteinte (*a*) est encore plus prononcée.

Ces constatations sont suffisamment éloquentes pour nous prouver que les sels de la bouillie bordelaise dissous par les eaux météoriques sont susceptibles de provoquer la décomposition du contenu cellulaire du parenchyme chlorophyllien et, partant, de supprimer en lui le phénomène

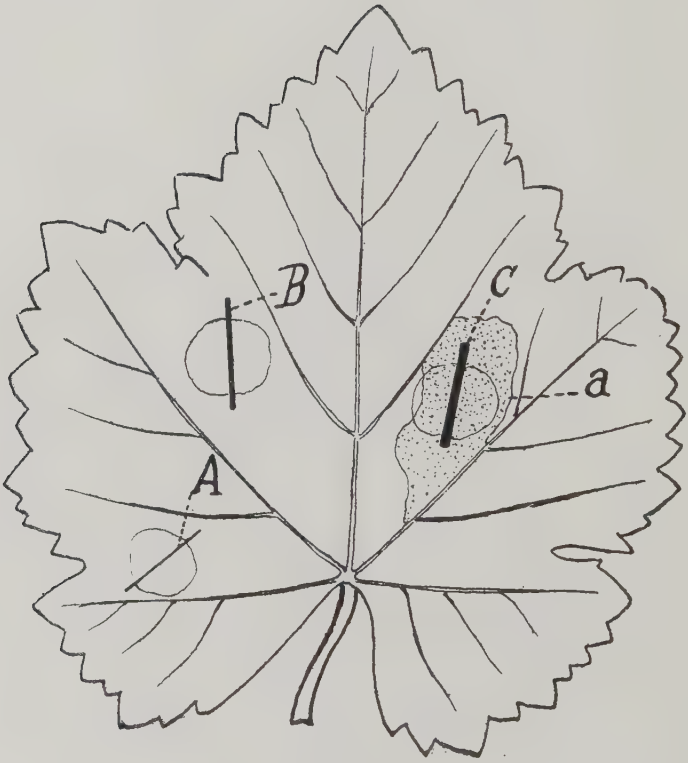


FIG. 12.

de photosynthèse. Mais elles nous montrent aussi que, conformément aux résultats que nous avons déjà exposés plus haut, il faut que la blessure intéresse toute la membrane externe des cellules épidermiques de la face supérieure du limbe pour qu'il y ait pénétration du liquide et, partant, nécrose.

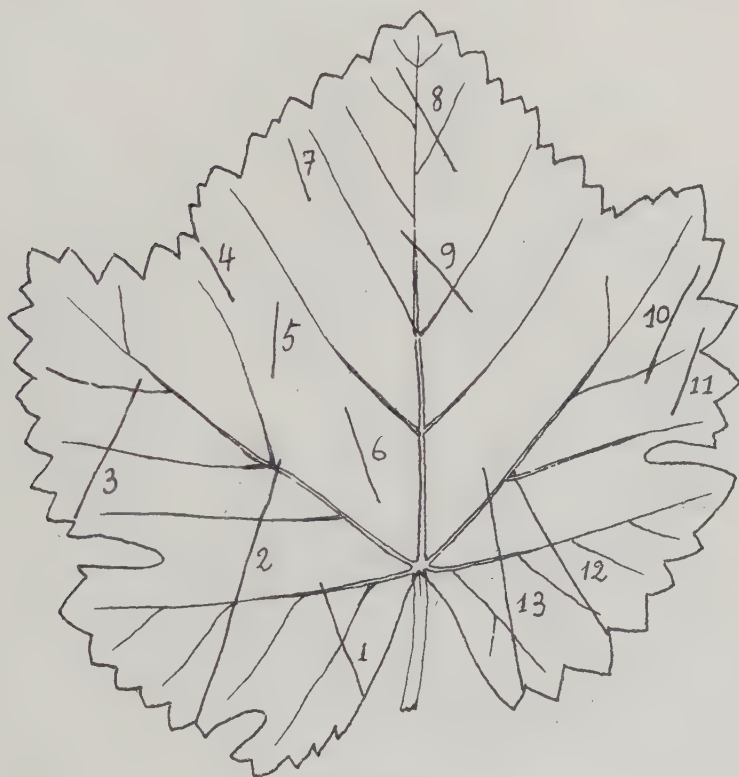


FIG. 13.

2^e Expérience. — Une feuille de Jacquez n'ayant jamais été sulfatée et appartenant à un pied de vigne n'ayant jamais reçu de « bouillie bordelaise », est prélevée et sérieusement froissée dans la main. Une fois dépliée, on peut remarquer sur ses deux faces des plis pénétrants que nous avons désignés, sur la figure 13, par les chiffres 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13.

On place ensuite cette feuille, ainsi froissée et dépliée de nouveau, dans l'eau récoltée, durant un orage, au bout des dents de feuilles de *Sémillon* sulfatées, et on observe de temps en temps ce qui se passe.

La figure 14 nous montre que le limbe, après une heure

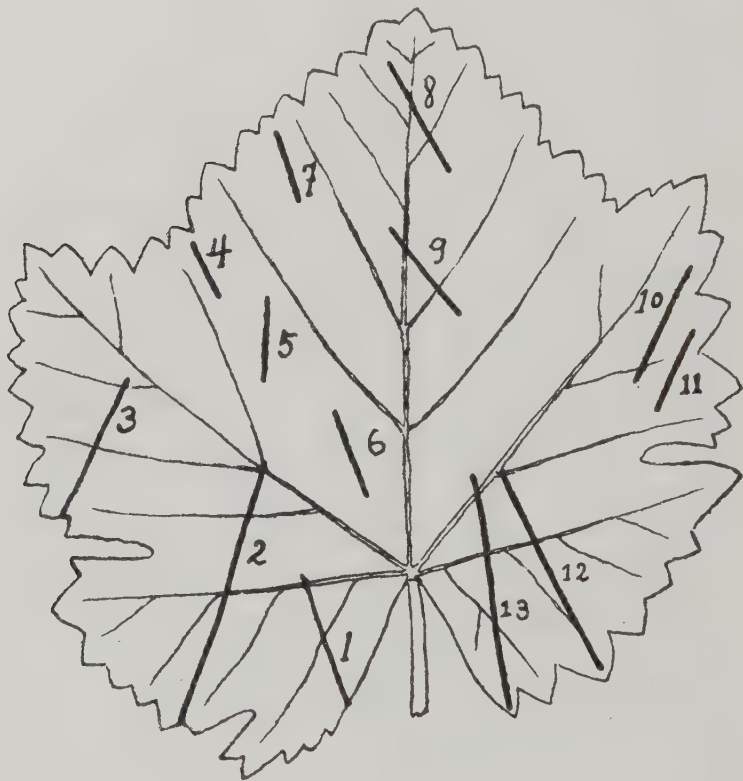


FIG. 14.

de macération, offre bien plus nettement au regard les plis résultant du froissement. C'est que, grâce à l'ouverture laissée entre les lèvres de ceux-ci, les sels de cuivre ont pénétré et ont commencé leur œuvre de nécrose.

La figure 15 nous montre un stade un peu plus avancé. Déjà, en effet, après deux heures de macération, il existe tout autour des plis pénétrants, et sur une mince surface (a),

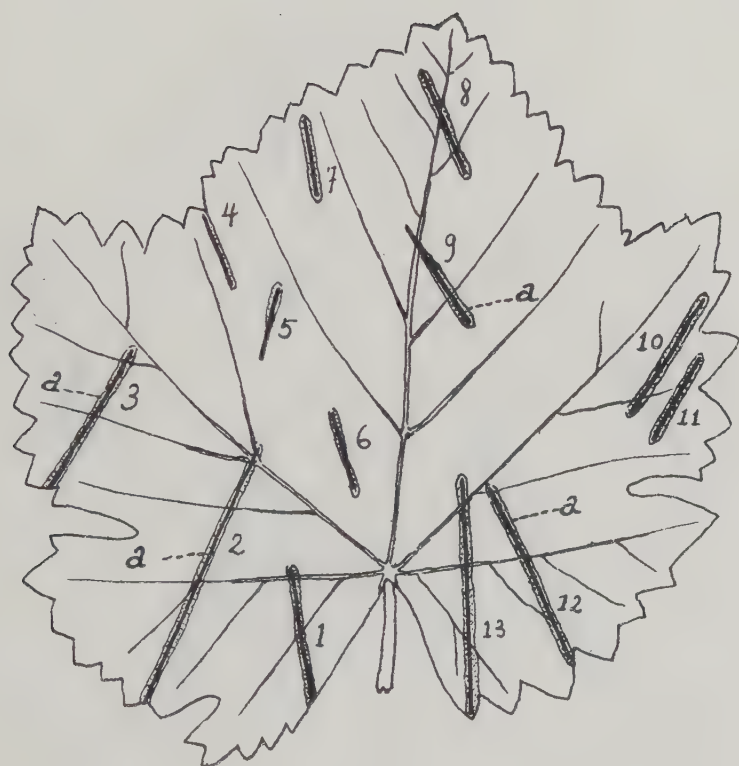


FIG. 15.

un changement de couleur du parenchyme chlorophyllien qui prouve que la nécrose fait son œuvre. Cette nécrose déborde de part et d'autre des lèvres des plis, soit complètement tout au tour (3, 10, 11, 12), soit partiellement (5, 9).

La figure 16 laisse apercevoir, après quatre heures de macération, une augmentation de l'aire de nécrose tout

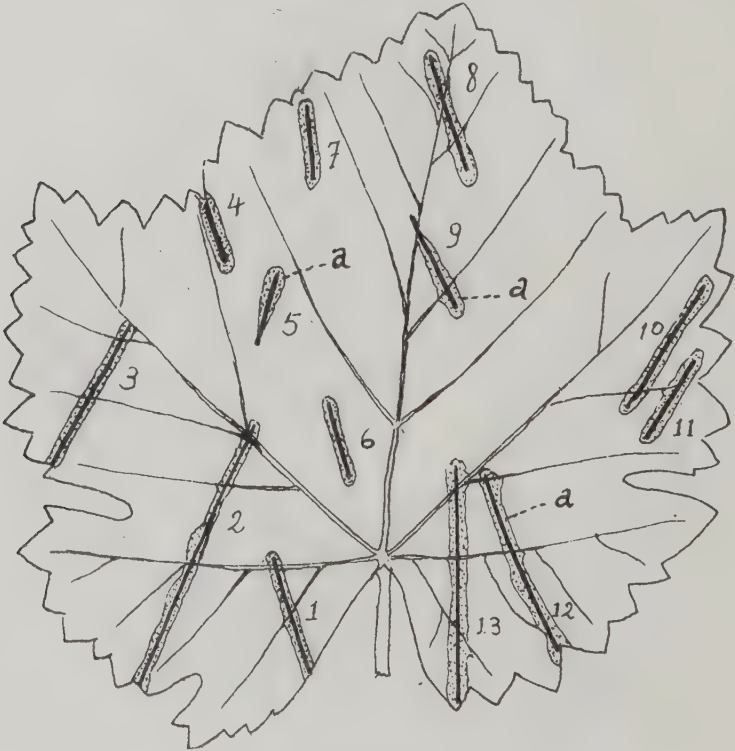


FIG. 16.

autour de chaque pli. De plus, la répartition de cette surface est régulière pour chacun d'eux.

La figure 17 nous montre encore les effets « nécrotiques » des sels de cuivre de la bouillie bordelaise après huit heures de macération. Les aires atteintes sont de plus en plus étendues.

De même après douze heures de macération. La figure 18 nous permet, en effet, de nous en rendre compte; car, à ce

stade, il y a déjà tendance, sur certains points, à la coalescence des aires atteintes. C'est ce que nous montrent nettement 12 et 13, où cette coalescence est un fait accompli. C'est ce que nous montrent encore 10 et 11, où la chose va se produire sous peu.

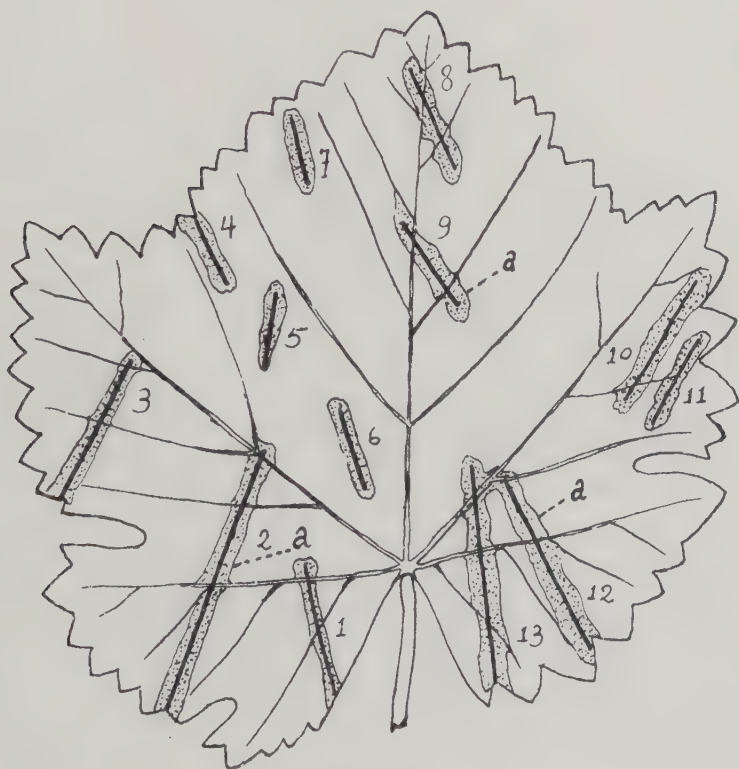


FIG. 17.

La même feuille, après vingt-quatre heures de macération, laisse voir une coalescence plus prononcée de 12 et 13, une coalescence complète de 10 et 11 et un accroissement général des aires nécrosées tout autour des plis.

La figure 20 représente la même feuille, après deux jours de macération. Comme on peut s'en rendre compte, coalescence et élargissement des aires de nécroses augmentent.

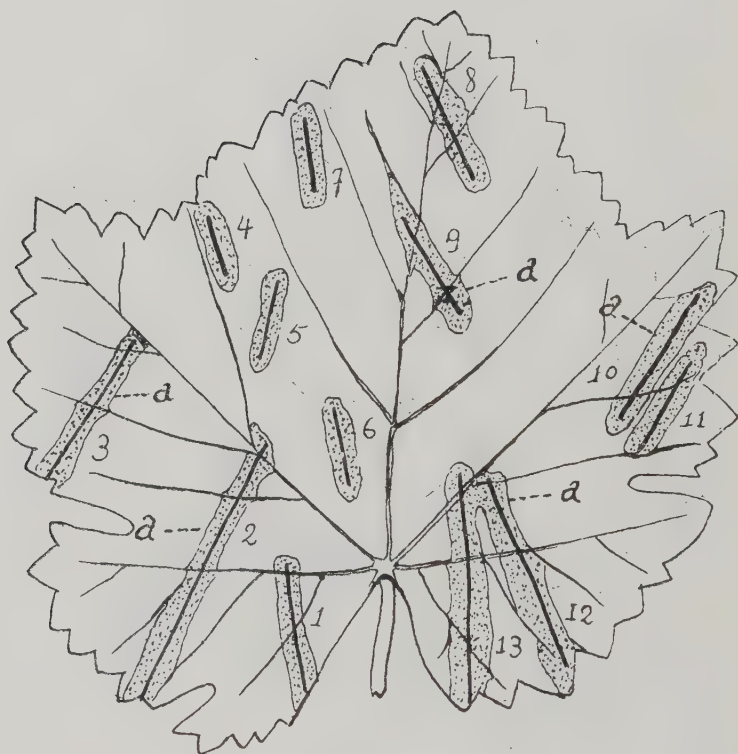


FIG. 18.

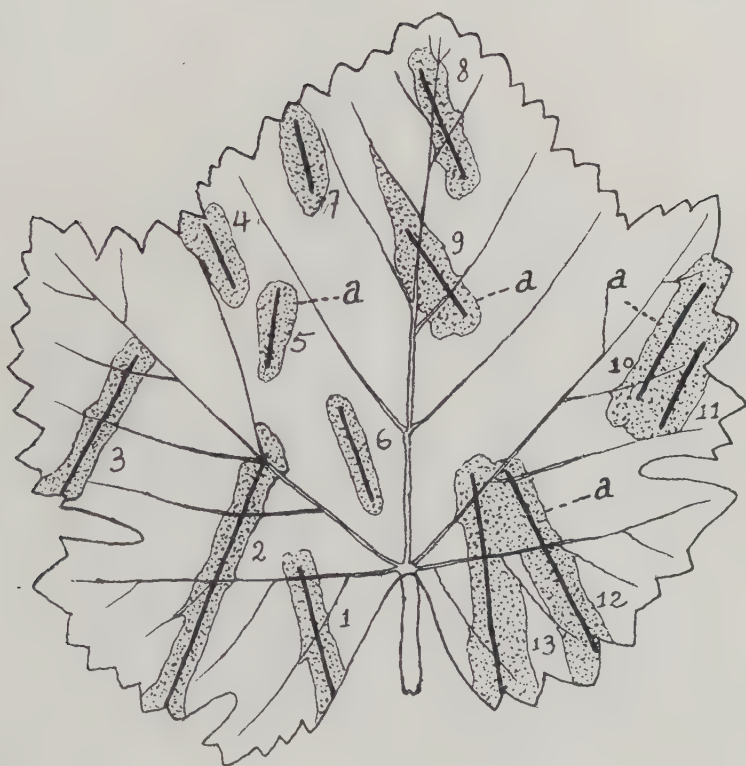


FIG. 19.

De sorte que la feuille, à ce stade, offre une mosaïque des plus nettes.

La même feuille, après trois jours de macération (fig. 21), présente une mosaïque bien plus développée. A telle enseigne que la surface nécrosée est très sensiblement égale à celle qui est indemne de toute attaque.

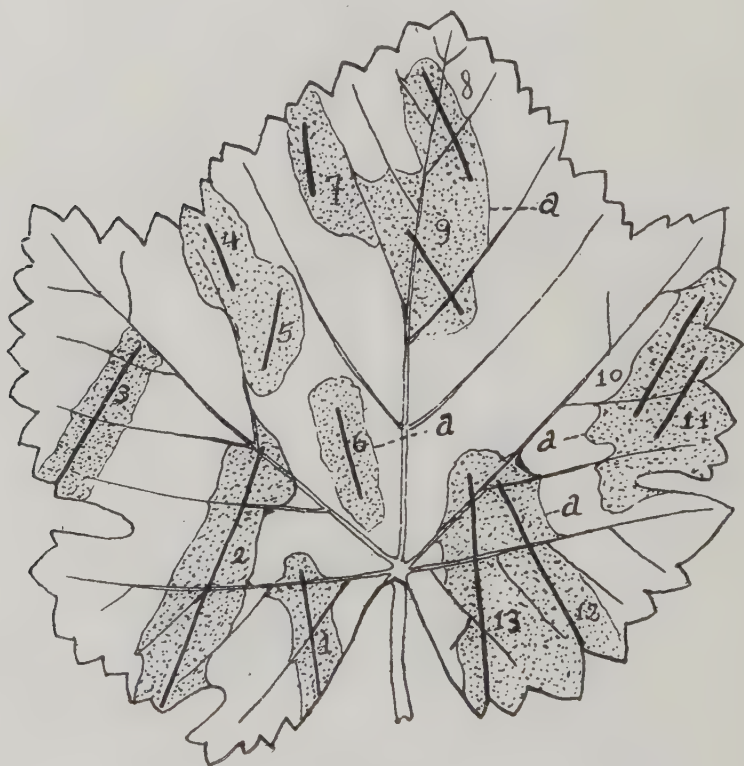


FIG. 20.

Enfin, après quatre jours de trempage dans le bain, l'aire nécrosée (fig. 22) dépasse de beaucoup l'aire restée saine grâce aux coalescences qui ont augmenté de nombre.

Les résultats acquis à la suite de cette deuxième expérience corroborent pleinement ceux que la première nous a permis d'enregistrer. On peut dire une fois de plus, en effet, que les sels dissous par les eaux météoriques à la

surface des feuilles traitées par la bouillie bordelaise sont capables de provoquer la nécrose des cellules chlorophylliennes.

On peut dire aussi, étant donnés le lieu d'application, la localisation et le mode d'accroissement des plages nécrosées,

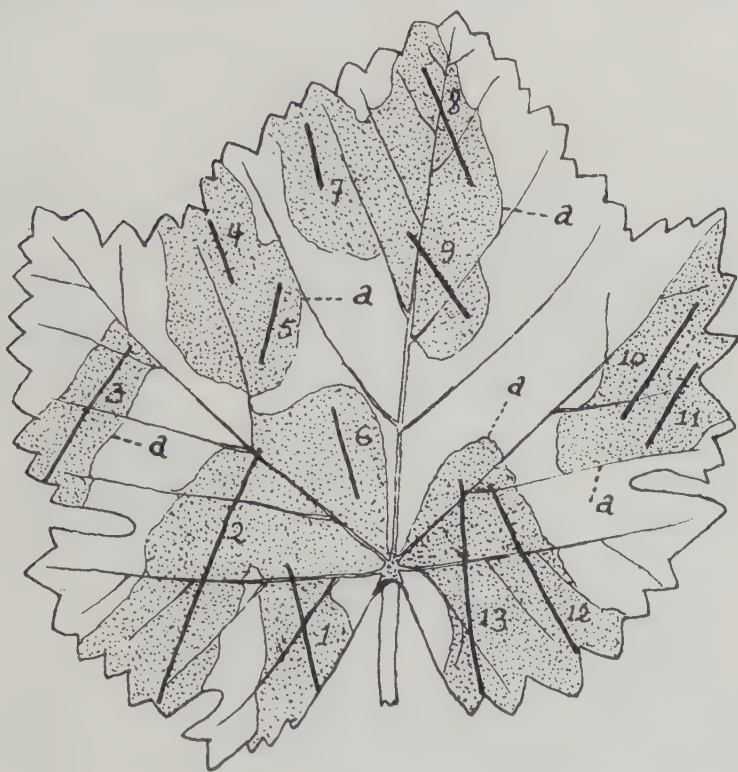


FIG. 21.

que l'infection qui les produit s'est effectuée, en grande partie au moins, par les blessures qu'on a artificiellement provoquées sur les deux faces en froissant la feuille et non pas exclusivement par les stomates de la face inférieure.

Cependant, pour être fixé nettement sur ce point, nous avons institué l'expérience suivante :

Une feuille de Jacquez, provenant d'un plant non sulfaté,

est froissée d'abord en la comprimant assez fortement dans la main. Puis, elle est de nouveau dépliée et consciencieusement vaselinée à sa face inférieure, de manière à obturer les ostioles des stomates ainsi que les blessures provoquées sur celle-ci par le froissement ou par toute autre cause.

Cette feuille est ensuite immergée dans l'eau de macéra-



FIG. 22.

tion, puis suivie de très près, de manière à observer ce qui se produit dans son intérieur.

Dans ce cas encore, on observe que l'attaque du parenchyme chlorophyllien se produit, et cette attaque s'étale d'autant plus que l'immersion est de plus longue durée.

Il résulte donc nettement de cette expérience que la pénétration se fait aussi par les blessures provoquées par le

froissement du limbe. On peut admettre, en effet, que les actions de surface entre la vaseline et l'eau soient assez puissantes pour entraîner le déplacement de la première et désobturer ainsi les ostioles; car l'état physique de la vaseline ne se prête à ce déplacement que d'une manière excessivement faible; lequel déplacement ne saurait, du reste, se produire qu'avec une extrême lenteur.

CONCLUSIONS

Il résulte des expériences précédentes que les sels de cuivre contenus dans la « bouillie bordelaise » et de nouveau dissous par l'eau de pluie ne sont pas fixés, eux non plus, par la cuticule. Ils sont, en outre, dans ces conditions, susceptibles de provoquer des plages nécrosées en pénétrant par les blessures profondes et pas suffisamment cicatrisées que peut accidentellement comporter la face supérieure des limbes.

Essai d'explication de la divergence des résultats acquis par Millardet et Gayon et par M. Bouygues.

Nous venons de voir, conformément à ce que M. BOUYGUES avait dit, que les membranes vraiment cutinisées ne fixent pas le sel de cuivre. Or, comment se fait-il que des savants de l'envergure de MILLARDET et GAYON aient pu affirmer le contraire ?

Lorsque, en 1903, GAYON (4) voulut démontrer, durant une séance de la Société des Sciences physiques et naturelles de Bordeaux, que la cuticule fixait bien le cuivre, contrairement à ce que M. BOUYGUES affirmait, il prit des lambeaux de cuticule de feuilles de vigne préparés par la méthode de

(4) U. GAYON, — *Loc. cit.*, p. 15 du présent travail,

l'acide sulfurique et conservés, depuis de longues années, dans un local contenant un liquide, de l'eau, sans doute. Ces lambeaux de surface assez importante étaient d'une couleur marron essentiellement fugace (5) et paraissaient dépourvus, du moins à l'œil nu, de toute trace de produits charbonnés.

GAYON prit alors, en séance, quelques-uns de ces lambeaux et les mit à macérer pendant un certain temps dans une solution de sulfate de cuivre. Il les en retira ensuite, les lava plusieurs fois à grande eau et les traita enfin par le ferrocyanure de potassium. Il les lava de nouveau, les jeta dans un cristalliseur plein d'eau claire et ils y apparurent nettement colorés en rose saumon pâle.

GAYON était donc en droit de dire aux membres présents à la séance que ce qu'ils avaient annoncé avec MILLARDET était bien fondé et que M. BOUYGUES avait certainement mal vu, mal observé.

Or, comme nous venons de le voir, M. BOUYGUES n'avait ni mal vu ni mal observé. Ses maîtres et lui-même avaient raison. Seuls étaient cause de ces résultats contradictoires, d'abord l'existence de fragments aussi ténus que nombreux de membranes, fixatrices de sels de cuivre, restés attachés à la cuticule et, ensuite, un phénomène physique encore inconnu à cette époque et auquel H. FREUNDLICH a donné le nom d'adsorption.

Car, quels que soient les soins apportés pour préparer la cuticule par la méthode de MILLARDET et GAYON, celle-ci n'est jamais pure.

Du reste, sous la direction de M. le professeur BOUYGUES, nous avons préparé de la cuticule par cette méthode. Et, quelles qu'aient été les précautions prises par nous (et elles furent grandes !) pour enlever de la face inférieure de la cuticule toutes les particules profondément altérées par l'acide sulfurique, nous n'y sommes point arrivé. Ces parti-

(5) MILLARDET l'avait du reste reconnu lui-même en son temps; voir p. 10 du présent travail,

cules donnaient aux lambeaux de cuticule une couleur ambrée que MILLARDET (6) avait déjà signalée. Elles étaient nettement visibles au microscope, à un fort grossissement. Elles existaient encore en très grand nombre à la face inférieure de la cuticule et devenaient ainsi le siège du phénomène d'adsorption à l'égard des solutions cupriques dans lesquelles on faisait macérer les lambeaux.

CONCLUSION

C'est donc dans le phénomène d'adsorption qu'il faut chercher l'explication de la divergence des résultats obtenus d'une part par MILLARDET et GAYON et, d'autre part, par M. BOUYGUES. On sait, en effet, combien les matières charbonneuses sont adsorbantes.

(6) MILLARDET. — *Loc. cit.*, p. 10 du présent travail.

CHAPITRE III

La cuticule et les colorants anticryptogamiques.

HISTORIQUE

Les expériences que nous venons de relater nous ont montré que la cuticule naturelle ne fixe, en aucun cas, les sels de cuivre. De sorte que celle-ci ne saurait acquérir au contact des poisons métalliques une immunité permanente comme l'ont affirmé MILLARDET et GAYON. En particulier dans le cas de la bouillie bordelaise, le bicarbonate de cuivre (1) qui se forme à la surface des limbes par l'action continue du CO_2 de l'eau de pluie sur l'hydrate d'oxyde de cuivre, ne constitue pas, avec la cuticule, un composé nouveau ou même ne l'imprègne pas.

(1) Nous avons pris connaissance des travaux que M^{me} et M. VILLEDIEU ont accomplis pour essayer de mettre en échec l'explication que MILLARDET et GAYON donnent du mode d'action de la bouillie bordelaise sur le Mildiou. Mais ces travaux purement chimiques n'avaient pour nous qu'un intérêt relatif, puisqu'il n'y est fait nullement allusion à la fixation possible des sels de cuivre par la cuticule. Toutefois, nous croyons bien faire en rappelant ici leurs titres :

M. et M^{me} G. VILLEDIEU. — De l'action des eaux météoriques sur les dépôts des bouillies cupriques. (*C. R. Acad. sciences*, t. CLXXI, p. 360, 9 août 1920.)

— De la non toxicité du cuivre pour les moisissures en général et pour le Mildiou en particulier. (*C. R. Acad. sciences*, t. CLXXI, p. 737, 18 octobre 1920.)

— De la toxicité des métaux pour les levures et les moisissures. (*C. R. Acad. sciences*, t. CLXXIII, p. 797, 2 novembre 1921.)

— Action des oxydes insolubles sur le Mildiou de la pomme de terre. (*C. R. Acad. sciences*, t. CLXXVI, p. 534, 1923.)

— De l'action des solutions de sulfate de cuivre sur le Mildiou. (*C. R. Acad. sciences*, t. CLXXIX, p. 1345, 8 décembre 1924.)

— Comment agissent les bouillies bordelaises alcalines. (*C. R. Acad. agric.*, France, t. X, n° 31, p. 886, 5 novembre 1924.)

Mais existe-t-il d'autres produits qui seraient susceptibles de l'imprégner et, partant, susceptibles d'assurer son immunisation à l'égard du Mildiou ?

C'est ce que nous allons voir maintenant.

Dans ces dernières années, on a pensé en effet à utiliser, contre ce champignon, les matières colorantes.

La lutte contre les maladies cryptogamiques basée sur l'action toxique de celles-ci est certainement un des problèmes les plus passionnants de la Biologie générale. Cette lutte, d'abord effectuée dans le règne animal et dont le bleu de Méthylène fait généralement les frais, a été étendue au Règne végétal. Dans ces dernières années en effet, on a pensé à utiliser contre les champignons et, en particulier, contre le Mildiou, les matières colorantes. On doit reconnaître cependant que la chimiothérapie était restée pour ainsi dire inexistante, au point de vue botanique, jusque dans ces dernières années. Mais en 1929, ce genre de médication fut tout d'abord étudié et appliqué par MM. TRUFFAUT et PASTAC (2) dans le Règne végétal. Et à la suite de leurs études, ils présentèrent une note à l'Académie des sciences qui fut, disons-le en passant, la première du genre.

Ces savants firent d'abord des expériences de laboratoire, en ensemençant *Rhizopus nigricans* et *Penicillium glaucum* sur liquide Raulin additionné d'une quantité variable du colorant organique qu'ils voulaient étudier et en immobilisant ce milieu par de la gélose. Or ils remarquèrent que le développement de ces moisissures se trouvait fortement gêné par la présence de ce colorant : le développement dans les cuvettes témoins se faisant avant quarante-huit heures.

En renouvelant ces expériences avec un certain nombre de produits, ils furent amenés à constater que quelques-uns de ces colorants, tels que le tétraméthyl-diaminotriphényl-chlorométhane (vert solide, vert diamant, vert malachite,

(2) G. TRUFFAUT et I. PASTAC. — La chimiothérapie des maladies des plantes par des colorants organiques. (C. R. Acad. sciences, t. CLXXXIX, p. 1013, 2 décembre 1929.)

etc.), entravaient tout développement jusqu'à la dilution de 1/25.000.

Sur des plantes parasitées, les solutions de colorants, appliquées seules pour détruire les champignons parasites, se montrèrent inefficaces. La tension superficielle de l'eau étant en effet trop élevée, les solutions colorées n'adhéraient pas aux tissus parasités.

Pour diminuer cette tension superficielle, ils commencèrent par rejeter les substances déjà utilisées telles que savon, mélasse, etc., trop sensibles aux influences chimiques. Par contre, des recherches effectuées avec les nouveaux adhésifs tels que la brécolane, l'encarnite, la florhanine, l'hélium, l'iporite, le léonyl, le nékal, le néomerpine, le nilo, etc., leur montrèrent que certains de ces corps étaient doués de particularités remarquables (résistance à la chaux, aux acides) tout en abaissant suffisamment la tension superficielle de l'eau.

Ces divers résultats obtenus, ils en firent application pour combattre le Blanc du rosier, le Blanc du pois, le Blanc du chêne. Ils pulvérisèrent alors les substances liquides sur la plante en plein air. A la suite de ces traitements, ils constatèrent qu'un grand nombre de colorants, reconnus efficaces contre ces parasites, provoquaient des brûlures sur les parties saines des feuilles comme par exemple l'héxaméthyl-triaminotriphénylchlorométhane (Pyoctanine bleue, violet cristallisé, etc.). Par contre, certains autres tels que le tétraméthyldiphénylméthylèneiminohydrochloré (Pyoctanine dorée, auramine, etc.) tuaient les parasites sans déterminer des brûlures sur les plantes hôtes.

Expérimentant ensuite sur le Mildiou et l'Oïdium de la vigne, ils constatèrent, en 1929, après de nombreux essais, que le Mildiou était moins résistant aux colorants organiques que les divers « Blancs » et que les *Rhizopus* et *Penicillium*. Par exemple « le tétraméthyldiphénylméthylèneiminohydrochloré (auramine) qui vis-à-vis du *Rhizopus* s'était montré à peine efficace dans les dilutions au 1/1.000,

détruisait encore le *Peronospora* en solution au 1/3.000. »

Le premier traitement du Mildiou avec de telles solutions colorées détruisit les conidiophores et les conidies. Le mycélium teint, même à l'intérieur des tissus parasités, paraissait aussi frappé de mort. La feuille portait, après traitement, des taches colorées à bords nets correspondant aux parties parasitées. Par contre, les parties non parasitées ne prenaient pas le colorant.

Dans le moment de grande virulence, et trois jours après le premier traitement, il apparaissait, à la périphérie des taches colorées, de nouveaux conidiophores isolés non colorés. Un deuxième traitement était alors effectué qui, lui, était pleinement curatif.

Enfin dans un cas de virulence extraordinaire, trois traitements successifs étaient nécessaires ; mais le dernier était radical. Quant à la feuille, une fois guérie, elle continuait ses fonctions et les parties colorées se subérifiaient.

Dans une autre note parue en 1930 dans la *Revue de Chimie industrielle* (3), ces mêmes auteurs après avoir de nouveau exposé longuement l'origine et la méthode du traitement de la chimiothérapie des maladies des plantes, énumérèrent les colorants qu'ils avaient employés, ainsi que les résultats de leurs nouvelles recherches. Qu'il nous soit permis, étant donnée la portée capitale de cette note, d'en reproduire ici la partie du texte ayant trait aux colorants.

« Les colorants les plus actifs furent : le vert malachite et son homologue, le vert brillant. Son analogue chloré (vert lumière) étant presque sans action.

« Parmi les colorants les moins actifs, outre certains colorants sulfonés (hélianthine, fuchsine S, carmin d'indigo), on peut citer le rouge neutre et le bleu de méthylène. On peut ajouter qu'il n'est pas possible de tirer une conclusion,

(3) G. TRUFFAUT et I. PASTAC. — Une nouvelle application des matières colorantes : la chimiothérapie des maladies des plantes. (*Revue de Chimie industrielle*, t. XXXIX, n° 458, p. 34, février 1930.)

concernant tous les champignons, de l'étude de l'action anti-cryptogamique d'un ou plusieurs colorants sur un ou plusieurs champignons.

« Le *Penicillium* se manifeste plus résistant que le *Rhizopus* envers la plupart des colorants. En outre la Phosphine A. C. R. (dérivé de l'acridine qui est en si grande faveur chez les médecins ; tripaflavine, acriflavine, etc.) est inefficace à 1/500 sur le *Rhizopus*. Mais appliquée dans les conditions convenables, elle est susceptible de détruire le Mildiou, même à la dilution de 1/3.000.

« Le même phénomène peut être noté en ce qui concerne le bleu de nuit.

« Le bleu de Nil est inefficace, car la moisissure se développe même sur la solution standard 1/100. »

Ils firent ensuite remarquer qu'il intervient un deuxième facteur. C'est le mode d'application. En effet alors qu'en chimiothérapie animale le médicament est en contact avec des liquides physiologiques qui l'absorbent, il n'en est pas de même ici. L'emploi externe étant le seul moyen rapide, le phénomène de la tension superficielle s'oppose à ce qu'une simple solution de colorant soit retenue par les feuilles atteintes. Il faudrait donc en plus employer un « activateur » abaissant la tension superficielle de l'eau et sans action sur le produit actif : ce qui déterminerait le rapport entre les deux facteurs, c'est-à-dire combinaison colorant et activateur, dans lesquelles un produit ne modifie pas les propriétés de l'autre.

Comme on le voit par ce qui précède, ces auteurs ne se sont jamais préoccupés de savoir si la cuticule fixait plus ou moins ces divers colorants. C'est là un fait qu'il y avait lieu de mettre nettement en évidence étant donné le genre de recherches que nous nous étions proposé de poursuivre.

Deux ans plus tard, c'est-à-dire en 1932, M. MARCARD (4)

(4) R. MARCARD. — De l'emploi de certains colorants dans la lutte contre le Mildiou de la vigne. (*Chimie et Industrie*, vol. 27, n° 1, p. 15, janvier 1932.)

fit paraître le résultat de ses recherches à propos de l'influence des matières colorantes sur le Mildiou de la vigne. Les colorants employés furent : l'orangé d'acridine brillant E et la phosphine brillante S, préparés industriellement par la Société anonyme des matières colorantes et produits chimiques de Saint-Denis.

La phosphine brillante S est le composé zincique d'orangé d'acridine brillant E.

Et voici comment M. MARCARD a résumé ses observations :

« Il est extrêmement difficile, pour ne pas dire impossible, de cultiver *Plasmopara viticola* (5) dans les conditions habituelles. Aussi dans les essais de laboratoire (6), est-on obligé de s'adresser à des moisissures banales, mais très résistantes, telles que *Rhizopus nigricans* ou *Penicillium glaucum*.

« Additionnons les milieux nutritifs courants de ces deux colorants. A la dose de 1/5.000 ces colorants provoquent déjà une gêne très nette dans le développement des cultures : gêne qui s'accroît évidemment avec l'augmentation de la dose de colorant et davantage au jour qu'à l'obscurité. Un large ensemencement paraît faciliter grandement le départ de la végétation alors qu'avec un ensemencement plus parcimonieux il se trouve retardé, ce qui a peut-être donné lieu à des interprétations favorables un peu hâtives.

« Des solutions nutritives au 1/2.000, exposées à l'air libre, sont restées stériles. »

Pour les applications viticoles, l'auteur employait des solutions contenant 500 grammes de colorant par hectolitre d'eau. La pulvérisation de ces solutions, additionnées d'un produit mouillant, donna lieu aux observations suivantes :

Les taches du Mildiou, atteintes par la pulvérisation, prenaient une coloration brune, perdaient en grande partie leur relief. Un examen microscopique permettait de constater que les conidies étaient très fortement colorées en

(5) *Plasmopara viticola* = Mildiou = *Peronospora viticola*.

(6) Nous renvoyons M. MARCARD aux essais de cultures de M. MILLARDET.

orangé, tandis que les filaments sporifères ne paraissaient présenter aucune coloration. Ces taches ne progressaient plus, à moins que des conditions atmosphériques particulièrement favorables ne provoquassent sur leur pourtour l'apparition d'une ceinture de conidiophores, laquelle nécessitait un deuxième et parfois même un troisième traitement.

Cela s'explique aisément. Le mycélium en effet, abrité à l'intérieur du parenchyme de la feuille, ne pouvait être atteint par le traitement et, partant, manifestait à nouveau sa vitalité toutes les fois que certaines conditions d'humidité et de température se trouvaient remplies.

Par ailleurs, la pulvérisation de la solution colorée parut jouir d'une activité préventive au moins égale à celle des bouillies cupriques, constatée sur les rangs témoins.

Quoi qu'il en soit, l'activité de l'orangé d'acridine parut être légèrement supérieure à celle de la phosphine.

En ce qui est de l'explication du mécanisme de l'action de ces colorants, l'auteur ajoute : « Les composés acridiniques sont des poisons protoplasmiques. Mais grâce à la fluorescence de leur solution, ils paraissent de plus conférer aux organismes qui en ont été imprégnés, une sensibilité spéciale aux rayons solaires, susceptible de provoquer certains phénomènes de photosensibilisation. »

Mais encore ici, comme on peut s'en rendre compte du reste par ce qui précède, M. MARCARD n'a nullement pensé à rechercher si la cuticule fixe ces colorants et, partant, s'ils sont susceptibles de la transformer en une source fongicide permanente.

Vers la même époque encore, M. le Professeur A. MEYER, dont les travaux sont si remarquables et remarqués, avait entrepris, durant les campagnes de 1930 et 1931, une série de recherches dans la Bourgogne. A cet effet, il avait distribué des produits à expérimenter à de nombreux viticulteurs et propriétaires de cette région viticole. Ceux-ci préparèrent leurs solutions antiseptiques eux-mêmes en suivant les indications données par ce savant et y addition-

nèrent la dose fixée de l'agent mouillant, envoyé également par M. MEYER, tout en tenant compte de la dureté de l'eau employée. Ces solutions furent pulvérisées ensuite dans les vignobles par la méthode dont on use habituellement pour les bouillies cupriques.

Dans ses expériences, M. MEYER fit employer les colorants appartenant aux groupes suivants :

- 1° Triphénylméthane : vert malachite et vert brillant ;
- 2° Phthaléines : rhodamine B (Schultz n° 573 ; Sisley n° 129) ;
- 3° Safranine ordinaire (Schultz n° 679 ; Sisley n° 135) ;
- 4° Acridine : orangé d'acridine (Schultz n° 603 ; Sisley n° 125) (exempt de zinc). (Tetraméthyldiaminoacridine) ;
- 5° Cétone-imide : auranine-pyocétanine jaune (Schultz n° 493 ; Sisley n° 120).

Il expérimenta aussi l'oxy-quinoléine, composé antiseptique bien connu employé sous le nom de quinosol ou sunoxol.

Comme agent mouillant, il choisit la brécolane N des Etablissements Beycopal. Après des expériences préliminaires, il fixa une concentration de deux pour mille.

Dans la note qu'il publia en 1932 (7), M. MEYER résuma dans le tableau suivant les concentrations des produits employés :

(7) A. MEYER. — Sur l'emploi des colorants et de diverses substances organiques dans la lutte contre les maladies cryptogamiques, en particulier le Mildiou de la vigne. (*La Terre de Bourgogne*, année II, n° 13, p. 193, 27 mars 1932.)

PRODUITS	CONCENTRATION DE L'EMPLOI	AGENT MOUILLANT
Vert brillant L.....	1/2,500	Brécolane
Vert brillant B.....	1/4,000	Oranit
Rhodamine B.....	1/2,700	Brécolane
Safranine B.....	1/2,500	Brécolane
Oranger d'acridine.....	1/3,000	Brécolane
Auramine.....	1/4,100	Brécolane
Pyoctanine jaune R.A.L.....	1/8,200	Brécolane
Oxy-quinoléine.....		
(a) Sunoxol R.A.L.....	1/6,250	Brécolane
Quinosol.....	1/5,000	Oranit
Quinosol.....	1/10,000	Oranit

Les résultats des expériences ainsi entreprises l'autorisèrent à écrire ce qui suit : « Les colorants qui paraissent avoir l'activité curative la plus considérable sur la vigne, déjà atteinte par le Mildiou, sont l'auramine (pyoctanine), l'orangé d'acridine et la safranine. Ensuite viendraient la rhodamine et les verts. Ces derniers auraient une influence beaucoup moindre et leur action nécessiterait généralement deux traitements pour être sensible sur les parties parasitées aux concentrations indiquées.

« En ce qui concerne l'action préventive, plusieurs expérimentateurs ont observé que les parcelles de vignes traitées par l'auramine et la pyoctanine conservaient pendant assez longtemps les feuilles et les grappes saines et vigoureuses, susceptibles de résister à de grosses invasions de Mildiou, alors que les vignes environnantes étaient déjà fortement attaquées bien qu'ayant subi, aux mêmes époques, plusieurs traitements cupriques. Mais lorsque l'influence du colorant cessait de se faire sentir, après son élimination par la pluie, la maladie finissait par envahir également les parties en expérience.

« Quant à l'oxy-quinoléine (sunoxol, quinosol), même aux faibles concentrations, son action, tant préventive que curative, parut tout à fait intéressante aux expérimentateurs qui l'employèrent. »

Donc, encore ici, la possibilité de fixation des matières colorantes par la cuticule n'a pas été envisagée, durant les expériences qu'a fait effectuer M. le Professeur MEYER.

RECHERCHES PERSONNELLES

Les études de chimiothérapie que nous venons de passer en revue nous permettent de remarquer que les auteurs précédents se sont peu souciés de savoir si les colorants employés par eux sont fixés par la cuticule et, partant, si celle-ci, à leur contact, peut acquérir une certaine immunité. Il nous a paru donc intéressant de combler cette lacune en effectuant des recherches dans ce sens.

Or, pour effectuer celles-ci, nous avons encore appliqué les méthodes de macération et d'imbibition d'abord à des feuilles de vignes variées (*Sémillon, Sauvignon, Muscadelle, Malbec, Cabernet Sauvignon, Noah, Othello*) et dans les deux cas les produits essayés, sous forme de solution, à deux pour cent, ont été :

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| 1° La Pyoctanine jaune. | 8° Le Vert diamant. |
| 2° Le Rouge neutre. | 9° Le Vert brillant. |
| 3° Le Bleu de nuit. | 10° L'Orangé III. |
| 4° Le Rouge Congo. | 11° La Safranine. |
| 5° L'Auramine. | 12° Le Bleu de Méthylène. |
| 6° Le Carmin d'Indigo. | 13° Le Sunoxol. |
| 7° Le Vert malachite. | |

Voici maintenant résumés les résultats obtenus par les deux méthodes.

I. — MÉTHODE DE MACÉRATION.

1° *Pyoctanine jaune*. — L'épicuticule n'est pas colorée. La cuticule proprement dite et le bois sont colorés en jaune foncé ; la zone sous-cuticulaire est aussi colorée en jaune, mais moins que la cuticule. En allant vers l'intérieur, en effet, cette coloration diminue d'intensité, jusqu'au voisinage de la couche celluloso-pectosique. Quant à cette dernière, elle est absolument incolore.

2° *Rouge neutre*. — L'épicuticule reste incolore. La cuticule se colore en rouge violacé. La zone sous-cuticulaire est de plus en plus pâle vers l'intérieur. Enfin la couche celluloso-pectosique n'est pas colorée. Quant aux éléments ligneux, ils sont eux aussi colorés en rouge pâle.

3° *Bleu de nuit*. — L'épicuticule reste naturelle. La cuticule et la zone sous-cuticulaire sont colorées en bleu foncé. Cette coloration va en diminuant vers l'intérieur. Quant à la couche celluloso-pectosique, elle reste incolore. Ici encore, le bois est coloré en bleu.

4° *Rouge Congo*. — L'épicuticule, la cuticule et la zone sous-cuticulaire restent incolores. Par contre, tous les tissus de nature celluloso-pectosique se colorent en rouge carmin.

5° *Auramine*. — L'épicuticule ne se colore pas. La cuticule se colore en jaune foncé. La zone sous-cuticulaire se colore aussi de même. Mais l'intensité de coloration diminue graduellement vers l'intérieur. Quant à la couche celluloso-pectosique, elle ne fixe pas le colorant. Le tissu ligneux est coloré en jaune.

6° *Carmin d'indigo*. — La coloration est négative pour toutes les parties de la coupe : épicuticule, cuticule et zone sous-cuticulaire, etc.

7° *Vert malachite*. — L'épicuticule reste naturelle. La cuticule et la zone sous-cuticulaire sont colorées en vert foncé. Cette coloration diminue graduellement vers l'intérieur de la zone sous-cuticulaire. Quant à la couche cellu-

loso-pectosique, elle reste incolore. Le tissu ligneux est, lui aussi, coloré en vert foncé.

8° *Vert diamant*. — Avec le vert diamant, les résultats sont les mêmes qu'avec le vert malachite.

9° *Vert brillant*. — Ici encore, l'épicuticule et la couche celluloso-pectosique restent incolores, mais la cuticule et la zone sous-cuticulaire se colorent en vert foncé.

10° *Orangé III (hélianthine)*. — Ne donne aucune coloration avec les tissus quels qu'ils soient.

11° *Safranine*. — Ici encore, l'épicuticule et la couche celluloso-pectosique ne se colorent pas. Mais la cuticule et la zone sous-cuticulaire se colorent en rouge carmin. Quant au bois, il fixe le dit colorant.

12° *Bleu de Méthylène*. — L'épicuticule et la zone celluloso-pectosique sont encore incolores. La cuticule et la zone sous-cuticulaire sont colorées en bleu foncé, ainsi que les tissus ligneux.

13° *Sunoxol*. — La coloration par cette substance est négative pour tous les tissus constituant la coupe.

II. — MÉTHODE D'IMBIBITION.

Pour expérimenter avec cette méthode, on a repris les mêmes feuilles de vigne ainsi que les substances qui, dans la méthode de macération, ont coloré la cuticule et la zone sous-cuticulaire, c'est-à-dire :

La Pyoctanine jaune.	Le Vert diamant
Le Bleu de nuit.	Le Vert brillant.
L'Auramine.	La Safranine.
Le Vert malachite.	Le Bleu de Méthylène.
Le Rouge neutre.	

On a donc déposé sur ces feuilles, indemnes de toute blessure et dont la turgescence était maintenue pendant toute la durée de l'expérience, une goutte de solution de chacun

de ces produits. On a fait varier la durée de contact de cette goutte avec le limbe. Après ce temps, on a lavé à grande eau la portion de surface sur laquelle avait reposé la goutte et on a effectué ensuite des coupes minces et transversales dans cette portion de surface.

Puis on les a observées et voici ce que leur étude nous a révélé.

Au bout de deux heures : aucune coloration de la part de l'épicuticule et de la cuticule.

De même au bout de quatre heures, de huit heures, de seize heures, de trente-deux heures. Du reste, cette non fixation s'est montrée indépendante de la feuille à laquelle appartenait la cuticule. Et c'est ainsi qu'avec : *Laurus nobilis* (Laura.), *Prunus Laurocerasus* (Rosa.), *Ficus elastica* (Morées), *Cytisus laburnum* (Papilion.), *Baptisia australis* (Papilion.), *Juglans regia* (Juglandées), *Morus alba* (Morées), *Citrus limonium* (Hespéridées), *Eleagnus hortensis* (Eléagnées), *Lysimachia ciliata* (Primula.), *Eupatorium racemosus* (Composées), etc., etc. le résultat a été le même.

Résumons maintenant dans un tableau les résultats obtenus en ce qui concerne la coloration des diverses zones de la membrane externe des cellules épidermiques :

(Voir tableau à la page suivante.)

PRODUITS	MÉTHODE DE MACÉRATION					MÉTHODE D'IMBIBITION				
	Épicuticule	Cuticule	Zone sous-cuticulaire	Zone celluloso-pectosique	Bois	Épicuticule	Cuticule	Zone sous-cuticulaire	Zone celluloso-pectosique	Bois
Pyoctanine jaune.	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Rouge neutre.....	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Bleu de nuit.....	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Rouge Congo.....	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>c</i>		<i>n</i>	<i>n</i>			
Auramine.....	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Carmin d'indigo..	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Vert malachite ...	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Vert diamant,....	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Vert brillant.....	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Orangé III.....	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Safranine.....	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Bleu de Méthylène	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			
Sunoxol.....	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>			

CONCLUSIONS.

En examinant ce tableau de près, on peut voir que, grâce à la méthode de macération, l'épicuticule reste incolore tandis que la cuticule est colorée par certains des produits essayés.

Par contre, dans la méthode d'imbibition, laquelle ne met pas directement en contact la cuticule avec le colorant, cette dernière zone et l'épicuticule restent toujours incolores.

C'est dire que l'épicuticule est non seulement réfractaire à toute fixation, du moins avec les produits essayés, mais encore empêche leur pénétration, laquelle serait démontrée si elle se produisait par la coloration de la cuticule avec la pyoctanine jaune, le rouge neutre, l'auramine, le vert brillant, etc., etc.

Cette dernière remarque nous permet de dire nettement que les colorants anticryptogamiques, au même titre que les sels de cuivre, ne sont pas fixés par la zone cutinisée et ne sauraient transformer celle-ci en une source fungicide permanente.

Durée de l'immunité donnée aux feuilles par les agents anticryptogamiques étudiés.

Les sels de cuivre et les colorants anticryptogamiques n'étant pas retenus et fixés par la cuticule, ne formant pas avec elle un composé capable non seulement de l'immuniser d'une manière définitive, mais encore de la transformer en une source fungicide permanente, leur action ne saurait s'exercer sur les Cryptogames inférieurs que pendant le temps qu'ils restent adhérents à la surface des limbes.

Aussi, lorsque les feuilles sont copieusement lavées par les eaux météoriques, ces substances anticryptogamiques sont enlevées peu à peu des surfaces foliaires qui redeviennent alors vulnérables.

Nous avons pu du reste nous en rendre facilement compte grâce aux nombreuses observations que nous avons faites dans les vignobles de Sainte-Croix-du-Mont (Gironde).

Bien des fois, il nous est arrivé en effet de recueillir pendant les orages l'eau s'écoulant de l'extrémité des dents des feuilles de vigne et de constater, à l'aide de quelques gouttes d'ammoniaque, la présence de cuivre dans celle-ci.

Bien souvent encore, il nous est arrivé de repérer une feuille et, chaque fois qu'il pleuvait, de récolter l'eau s'écoulant de l'extrémité de ses dents. Nous avons ainsi, par ce dernier mode d'expérimentation, toute une série de tubes témoins qui, traités par l'ammoniaque, constituaient une échelle colorée des plus intéressante. En effet, toutes conditions de récupération restant les mêmes, la coloration

bleue de l'eau des tubes diminuait d'intensité au fur et à mesure que les précipitations atmosphériques devenaient de plus en plus nombreuses.

Il nous est même arrivé de ne pouvoir décèler la présence du cuivre, d'une façon nette, dans l'eau ainsi récoltée qu'en mettant une coupe anatomique faite dans un tissu celluloso-pectosique fortement mordancée par l'hypochlorite et copieusement lavée. On sait qu'une telle coupe (8) ainsi préparée, plongée dans un liquide très pauvre en cuivre, récupère ce métal qui peut être révélé ensuite dans les membranes celluloso-pectosiques par le ferro-cyanure de potassium.

Il se produit en somme là quelque chose d'analogue à l'expérience suivante signalée par JACQUES DUCLAUX (9). Prenons un ou deux litres d'eau distillée tiède, puis ajoutons une goutte d'une solution au millième de vert malachite. Le liquide ne sera pas perceptiblement coloré. Plaçons dans un tel liquide quelques brins de soie blanche. Au bout de quelques heures, ils seront teints en vert. Les actions de surface auront joué, l'adsorption se sera produite.

Quoi qu'il en soit, les eaux météoriques exercent une action épuisante sur les substances anticryptogamiques placées à la surface des feuilles, puisqu'elles les entraînent peu à peu par simple et constant lessivage de la face supérieure des limbes.

De sorte que, plus on pourra rendre ces corps adhérents à ces surfaces, et plus leur action sera de longue durée. Autrement dit, tout se borne à une question d'adhésivité (10).

(8) H. DEVAUX. — *Loc.-cit.*, p. 13 du présent travail.

(9) J. DUCLAUX. — *Les colloïdes*, p. 154. (Gauthier-Villars & C^{ie}, éditeurs, 1929.)

(10) A. BOUTARIC. — *Les colloïdes et l'état colloïdal*, p. 156. (Félix Alcan, éditeur, 1931.)

Serait-il avantageux pour la plante que l'anti-cryptogamique formât un composé, anticryptogamique lui-même, avec la cuticule de la face supérieure du limbe ?

Pour répondre à cette question, il faut se demander si vraiment l'infection des feuilles par le Mildiou et, en particulier des feuilles de vigne, peut se faire par la face supérieure, autrement dit si le tube mycélien provenant de la germination des zoospores arrêtées est susceptible de perforer la cuticule et, partant, d'envahir le parenchyme chlorophyllien.

Or, disons de suite que, à ce propos, les avis sont très partagés. Qu'on en juge du reste par les quelques citations qui suivent.

En 1887, MILLARDET (11) écrivait : « Le 19 septembre, quatre feuilles adultes de *Chasselas* sensiblement de même âge puisqu'elles étaient placées l'une à la suite de l'autre sur le même sarment, sont cueillies dans l'orangerie, chacune avec un fragment de la tige qui la porte, et lavées avec soin sur les deux faces, à l'aide d'une brosse fine, dans l'eau de pluie. Elles sont ensuite placées à l'obscurité, le fragment de tige qui porte chacune d'elles plongé dans un verre contenant de l'eau. Lorsque toute trace d'eau à leur surface a disparu, les deux verres qui les contiennent sont placés sous deux grandes cloches reposant sur deux plats dont le fond est recouvert d'eau. Sur les parois des cloches, un papier à filtrer imbibé d'eau sert à maintenir une humidité constante. Les cloches sont placées à l'orangerie, l'une à côté de l'autre, dans un demi-jour.

« Le 20, de 1 heure à 2 heures de l'après-midi, une cinquantaine de touffes de Mildiou, bien fraîches et en pleine

(11) MILLARDET. — *Loc. cit.*, p. 10 du présent travail.

végétation, sont raclées sur des feuilles, à l'aide d'un scalpel fin, et plongées, au fur et à mesure de leur préparation, dans deux centimètres cubes d'eau de pluie contenus dans un verre de montre.

« A 4 heures, on s'assure, en examinant au microscope quelques gouttes de l'eau du verre de montre, que cette eau fourmille de zoospores en mouvement. On peut estimer qu'il y a une cinquantaine de ces animalcules dans une goutte d'eau d'assez faible grosseur.

« A l'aide d'une petite baguette de verre que l'on plonge d'abord dans l'eau du verre de montre et que l'on porte ensuite sur les feuilles, on dépose à la surface de ces dernières de petites gouttes d'eau de la grosseur de celles dont il vient d'être question, c'est-à-dire qui contiennent une cinquantaine de zoospores en mouvement.

« L'une des feuilles (A) reçoit 100 gouttes d'eau disposées régulièrement à l'aisselle des ramifications principales des nervures sur sa face supérieure.

« L'autre (B) reçoit 120 gouttes d'eau disposées de la même façon à la face inférieure.

« La troisième (C) reçoit 80 gouttes sur la face supérieure de sa moitié droite et 90 gouttes sur la face inférieure de sa moitié gauche.

« La quatrième feuille (T) ne reçoit aucune semence de *Peronospora* et sert de témoin.

« L'opération terminée, les cloches sont remises en place sur les feuilles en expérience.

« Quarante-huit heures après, le 22 dans l'après-midi, elles sont relevées et les feuilles examinées. A ce moment, les gouttes de l'infection, légèrement diminuées par l'évaporation, sont toutes encore très visibles. On laisse les cloches ouvertes jusqu'à ce que ces gouttes aient disparu, puis on les replace sur les feuilles.

« Jusqu'au 26, à midi, aucun changement.

« Le 27, à midi : A, rien ; — B, 23 petites touffes de *Peronospora* correspondant aux petits points infectés ; —

C, moitié droite, rien ; moitié gauche, 50 petites touffes de *Peronospora* correspondant aux points infectés ; — T, rien.

« Le 28, à midi : A, rien ; — B, 82 touffes de *Peronospora* correspondant, etc., et dont quelques-unes reposent sur des taches légèrement brunâtres par transparence ; — C, moitié droite, 2 touffes correspondant, etc. ; moitié gauche, 72 touffes correspondant, etc. ; — T, rien.

« Le 29, à midi : A, 2 touffes correspondant, etc. ; — B, 101 touffes, la plupart reposant sur des taches brunâtres de la feuille ; — C, moitié droite, pas de changement ; moitié gauche, 74 touffes sur taches brunâtres ; — T, rien.

« Le 30, à midi : A, 3 touffes correspondant, etc., sur taches brunâtres ; — B, 108 touffes correspondant, etc., la plupart sur taches brunes et commençant à se dessécher au centre ; — C, moitié droite, pas de changement autre que l'extension et le brunissement des taches ; moitié gauche, 80 touffes, etc. ; — T, rien.

« Le 2 octobre, pas de changements. A cette époque, les touffes de *Peronospora* ainsi que les taches brunes sur lesquelles elles reposent sont une fois et demie à deux fois aussi larges qu'elles étaient dès l'origine et ces dernières commencent, pour la plupart, à se dessécher au centre. Enfin, depuis quatre jours, les feuilles se sont nuancées de jaune au pourtour des taches. La feuille C, par exemple, a sa moitié gauche régulièrement marbrée de jaune et de vert, tandis que la moitié droite possède une couleur normale, sauf aux deux points où l'infection a réussi.

« Pendant la durée des observations, les minima (6 heures du matin) ont varié entre 16° et 19° C. et les maxima (2 heures du soir) entre 21° et 29° C., ce qui donnerait une température moyenne de 20°5 environ.

« Cette expérience démontre que si, dans les conditions de température, d'humidité, etc., dans lesquelles nous opérons, les infections sur la face inférieure des feuilles de *Chasselas* réussissent dans la proportion de 90 %, sur la face supérieure elles ne réussissent guère que dans la pro-

portion de 3 %. C'est pour cette raison que nos essais ultérieurs d'infection ont eu lieu sur la face inférieure des feuilles.

« Ceci n'empêche pas qu'à l'état normal, l'infection des feuilles n'ait lieu, la plupart du temps, par la face supérieure de ces organes. Il sera bon de remarquer que le *Chasselas*, dont nous nous sommes servi, faute d'un autre cépage, pour nos expériences est, parmi les variétés européennes, une des plus résistantes au Mildiou. »

Cette conclusion est vraiment inattendue ! Elle est loin de découler de l'expérience. Mais étant donnée la personnalité de MILLARDET, elle fut admise sans conteste et d'autant plus que les résultats des traitements appliqués à la face supérieure des feuilles la justifiaient pleinement.

En 1891, R. HARTIG (12) écrivait : « Le mode d'attaque des champignons est également très varié. Tandis que les épiphytes, dont le mycélium végète sur l'épiderme des feuilles, des fruits et des tiges, envoient seulement de grêles suçoirs dans des cellules épidermiques, les endophytes font pénétrer dans l'intérieur des végétaux leur mycélium ou les filaments qui doivent porter les spores à l'extérieur.

« D'après le mode d'attaque, on distingue deux groupes : le premier comprenant les parasites qui peuvent envahir la plante intacte, le second ceux qui ne pénètrent que par des lésions préexistantes (maladies infectueuses à la suite de blessures). Le premier groupe n'attaque ordinairement les plantes, soit leurs pousses, leurs feuilles, leurs racines, que dans leur état jeune ; rarement les champignons pénètrent dans les stomates et les lenticelles de feuilles et tiges déjà âgées. »

Donc, d'après cette citation, pour HARTIG certains champignons seraient susceptibles de pénétrer dans les cellules épidermiques en perforant leur cuticule, même si cette

(12) ROBERT HARTIG. — *Traité des maladies des arbres*, p. 49. (Berger-Levrault & C^{ie}, éditeurs, Paris, 1891.)

pénétration se faisait par la membrane commune à deux cellules voisines.

En 1895, PRILLEUX (13) s'exprimait ainsi : « Au sortir de la conidie les zoospores nagent très vivement en tournant tantôt dans un sens, tantôt dans un autre ; les changements de direction sont fréquents. Par moment, surtout quand ils se ralentissent, les mouvements se font par petites saccades très marquées.

« Après une demi-heure, ou plus, de course en tous sens dans la goutte d'eau où était tombée la conidie, les zoospores se fixent. Devenues immobiles, elles prennent une forme globuleuse puis émettent un petit tube de germination qui est capable de percer l'épiderme d'une feuille de vigne et de pénétrer dans son intérieur pour y devenir un mycélium. »

Donc, pour PRILLEUX, il n'y a aucun doute : l'épiderme est percé par le tube mycélien provenant du développement de la zoospore arrêtée.

En 1911, MÜLLER-THURGAU (14), après avoir fait de nombreuses tentatives d'infection par les faces supérieure et inférieure des limbes des cépages *Pinot* et *Chasselas*, publia un travail où il affirme que les infections de la face supérieure n'ont jamais abouti à un succès ; celles de la face inférieure, au contraire, ont réussi dans la proportion de 35 à 94 %.

Et l'auteur conclut : « Nous ne sommes jamais arrivé, dans de nombreux essais, à infecter une feuille par sa face supérieure, même en répandant de l'eau contenant des spores, le long des nervures, où se trouvent cependant quelques très rares stomates. Le *Plasmopara viticola* n'a, de même, jamais pu pénétrer par des déchirures faites à l'épiderme de la face supérieure »

(13) ED. PRILLEUX. — *Maladies des plantes agricoles*, p. 104. (Firmin Didot & C^{ie}, éditeurs, Paris, 1895.)

(14) MÜLLER-THURGAU. — *Progrès agricole et viticole*, 1911.

On ne peut être plus affirmatif en ce qui concerne l'infection des feuilles de vigne par la face supérieure.

En 1912, GREGORY ayant fait lui aussi des essais d'infection, publia le résultat de ses expériences qu'il résuma dans un tableau suivant :

Essais d'infection.

DATE	INOCULATION		INFECTIONS RÉUSSIES	
30 juin...	3	feuilles face supérieure	0	
9 juillet.	7	— —	0	
14 juillet.	6	— —	0	
			DESSOUS	DESSUS
19 juillet.	16	inoculations dessous	4 dessus ?	0
28 juillet.	18	— —	» 13	»
30 juillet.	33	— —	8 — 13	0
1 ^{er} août ..	29	— —	9 — 26	0
5 août ..	40	— —	» 8	»
6 août ..	65	— —	» 10	»
13 août ..	60	— —	3 — 20	0
15 août ..	58	— —	» 24	»
16 août ..	57	— —	» 46	0
18 août ..	50	— —	» 47	»
19 août ..	37	— —	» 34	»
23 août ..	»		37 —	0
24 août ..	»		40 —	0
28 août ..	»		56 —	0
31 août ..	»		38 —	0
TOTAUX.	454		195	241
				0

Comme on le voit, GREGORY (15) était arrivé aux mêmes résultats que MÜLLER-THURGAU.

Dans son traité de Parasitologie des plantes agricoles,

(15) C.-T. GREGORY. — Spore germination and infection with *Plasmodium viticola*. (*Phytopathology*, 1912.)

le Docteur NEVEU-LEMAIRE (16) dit à propos du *Phytophthora infestans* : « La zoospore (z, fig. 23) une fois fixée sur la plante hospitalière, donne issue à un filament qui pénètre dans les tissus après avoir perforé l'épiderme (ep) »

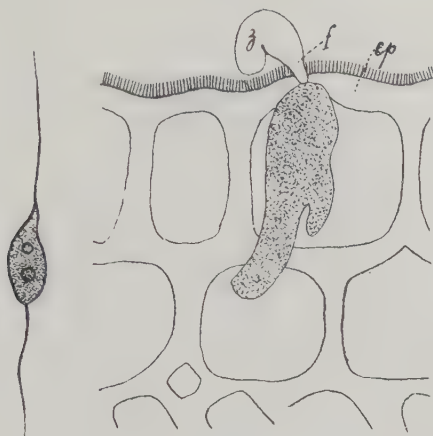


FIG. 23.

Zoospore libre de *Phytophthora infestans*
et sa germination sur une feuille.
(D'après SORAUER.)

En 1913 encore, MM. DE ISTWANFFY et PALINKAS (17) obtinrent des résultats semble-t-il différents. En effet, en déposant sur la face supérieure les gouttes d'inoculation, soit sur les nervures, soit simplement sur les dents ou dans les angles formés par les nervures, les infections par cette face réussirent suivant le cépage, dans la proportion de 3 à 12 %, alors qu'à la face inférieure la réussite atteignit 95 à 98 %. Or, cette différence n'est pas réelle, car aux endroits de la face supérieure où furent déposées les gouttes d'inoculation,

(16) M. NEVEU-LEMAIRE. — *Traité de parasitologie des plantes agricoles*, p. 67. (Lamarre & C^{ie}, éditeurs, Paris, 1913.)

(17) G. DE ISTWANFFY et PALINKAS. — *Etude sur le Mildiou de la vigne*, Budapest, 1913.



FIG. 24.

Taches de Mildiou sur le bord de la feuille.
(D'après RAVAZ.)

il existe des stomates, rares il est vrai, mais en nombre suffisant toutefois pour favoriser l'infection.

Dans les essais faits par RAVAZ (18), les infections de la face supérieure ne donnèrent souvent aucun résultat. A ce propos, l'auteur s'exprime ainsi : « Il en est ainsi, semble-

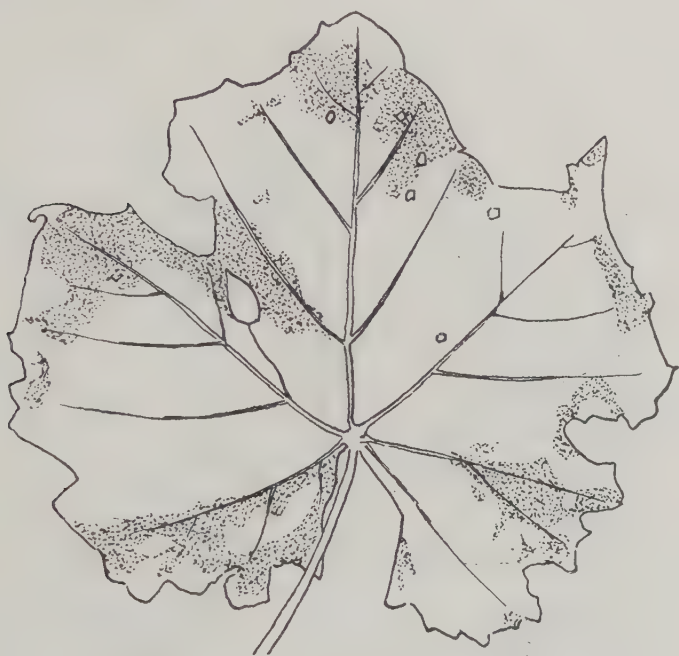


FIG. 25.

Feuille mildiouée montrant la localisation du Mildiou sur les bords. (D'après RAVAZ.)

t-il, quand on opère sur des feuilles qui sont arrivées à l'état adulte. Par contre, sur des feuilles en voie de croissance rapide, on obtient quelques succès le long des nervures et sur les dents qui, comme on le sait, portent aussi des stomates.

« Nous concluons de tout ceci : que dans la pratique, la

(18) L. RAVAZ. — *Le Mildiou*, p. 82. (Collet fils, éditeurs, Montpellier, 1914.)



FIG. 26.

Taches isolées sur le pourtour de la feuille. (D'après RAVAZ.)

contamination des feuilles a lieu généralement à la face inférieure, par des germes qui ont pu y être apportés directement par le vent, mais qui, le plus souvent, viennent, ainsi que nous avons pu l'établir, de la face supérieure en

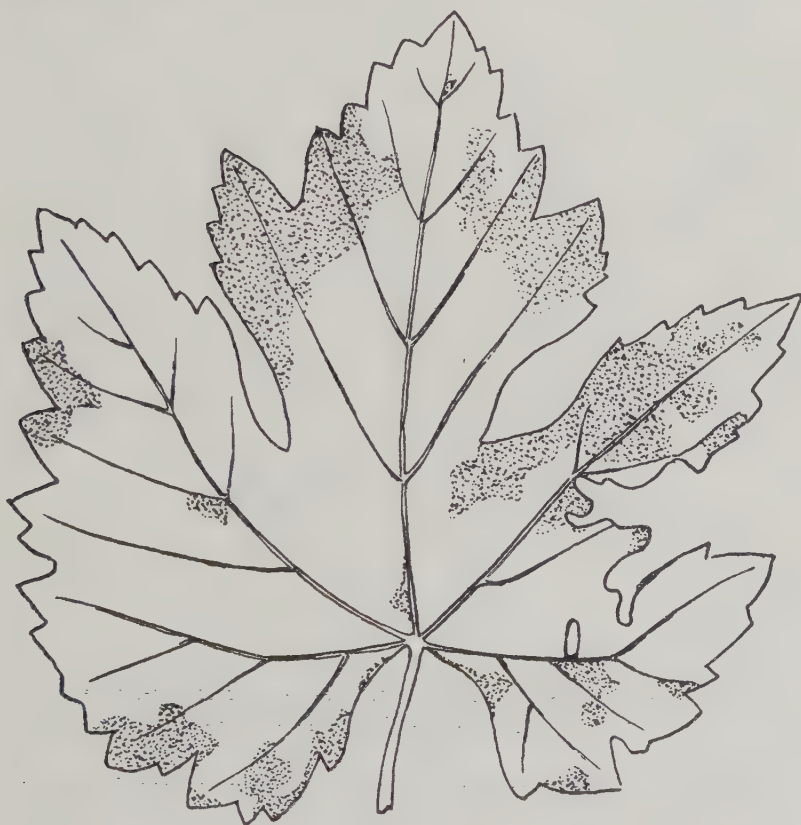


FIG. 27.

Taches nombreuses sur les bords. (D'après RAVAZ.)

nageant dans l'eau de pluie ou de rosée, recouvrant partiellement ou totalement les deux faces. C'est pourquoi les altérations sont si souvent localisées sur le pourtour des feuilles, comme le montrent les figures 24, 25, 26 et 27.

C'est par les stomates que le tube germinatif pénètre dans

les tissus. Il semble même que les zoospores sont attirées par ouverture stomatique, car elles y sont plus nombreuses que sur les tissus environnants. La figure 28 montre comment les choses se passent, que les zoospores proviennent des conidies d'été ou des macroconidies. »

Donc, pour RAVAZ, c'est généralement par la face infé-

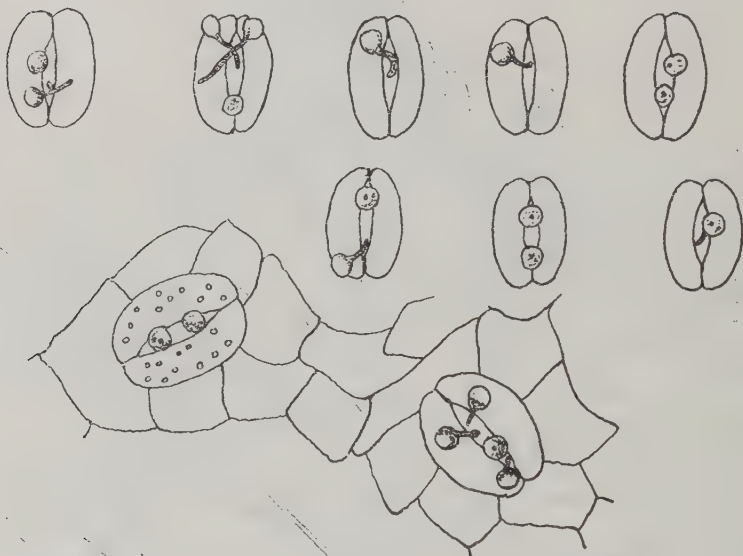


FIG. 28.

Infection se produisant par les zoospores à la face inférieure du limbe et par les ostioles. (D'après RAVAZ.)

rieure que se fait l'infection. Les zoospores, après être nées sur la face supérieure, se meuvent facilement dans l'eau qui recouvre plus ou moins totalement les deux faces et, passant sur la face inférieure, infectent la feuille par les stomates.

Enfin, en 1927, DELACROIX (19) écrivait : « Il est à observer que, dans la circonstance, une solution de continuité préalable du tégument de l'hôte n'est pas absolument

(19) G. DELACROIX. — *Maladies des plantes cultivées*, p. 321, Paris, 1927.

indispensable à la pénétration de ce filament germinatif. Si dans le *Puccinia graminis* le filament germinatif esquivé cette irruption en pénétrant par un stomate, au moins pour la forme *Uredo*, dans d'autres circonstances, des champignons qui se comportent de même au point de vue biologique peuvent sans difficulté perforer le tégument et opérer leur pénétration sans le recours d'une plaie préexistante. C'est le cas de nombreuses Péronosporées. Cette pénétration suppose évidemment de la part du parasite l'élaboration d'une matière chimique particulière capable de détruire, en la solubilisant, la matière de la membrane : cellulose, matière inter-cellulaire ou, même, cutine. Ces deux propriétés : impossibilité de végéter en dehors du protoplasma vivant, production de ces substances diastiques susceptibles de dissoudre, de digérer la membrane vivante, sont les attributs de ce genre de parasites, qui sont dès lors qualifiés parasites nécessaires, parasites obligatoires, par cette raison que chez eux le parasitisme est une propriété biologique essentielle.

« Si nous considérons maintenant un autre groupe de parasites, les polypores par exemple, qui se rencontrent fréquemment sur les végétaux ligneux, l'expérience nous montrera que pour les spores de ces espèces, le filament germinatif est incapable de perforer, en général, le tégument protecteur externe, dont la structure est d'ailleurs plus complexe et mieux adaptée au rôle d'organe de défense par suite de la présence d'un tissu subéreux, que chez les plantes herbacées. Dans ce cas, l'irruption dans les tissus vivants ne peut se faire que s'il existe une solution de continuité préalable. Cette impossibilité de pénétrer le tégument externe n'exclut pas d'ailleurs, dans nombre d'espèces de ce groupe, la possibilité de destruction des membranes vivantes par les sécrétions du mycélium ; il n'est pas rare, en effet, chez les polypores en particulier, de constater la production de principes sécrétés qui pénètrent et tuent les éléments figurés, contenant et contenu, avant que le mycé-

lium les ait envahis. De cette manière, les sécrétions élaborées par le mycélium lui préparent en même temps la voie et l'aliment. Les parasites de ce groupe qui sont incapables, à l'état ordinaire, de forcer la résistance opposée par les tissus externes, parasites qui ne peuvent pénétrer que grâce à une blessure préalable de ces tissus, sont appelés à juste titre des parasites de blessure. »

Comme on le voit par ce qui précède, les avis sont bien partagés en ce qui concerne le mode d'infection des feuilles de vigne par la face supérieure du limbe. Toutefois, il ne faut pas oublier que, étant donnés l'enchevêtrement et l'orientation de ces feuilles, c'est la face supérieure qui est la plus exposée à la contamination. De sorte qu'il est rationnel de les recouvrir d'un anticryptogamique puissant jouissant des propriétés que nous avons énoncées plus haut. De cette façon, l'eau météorique qui contribuerait à donner la vie à la conidie et, partant, aux zoospores, deviendrait un poison mortel pour celles-ci. En somme, elle leur donnerait à la fois la vie et la mort !

Evidemment, ce serait l'idéal que d'avoir un produit qui, tout en étant anticryptogamique de surface, le devienne en profondeur, autrement dit qui fut susceptible de former, avec les zones cutinisées naturelles de la membrane externe des cellules épidermiques, un composé nouveau susceptible de jouer le rôle de poison violent.

Il ne faut pas oublier, en effet, qu'un poison est un corps dont les propriétés chimiques provoquent une perturbation fonctionnelle dans le protoplasma vivant, laquelle entraîne plus ou moins vite la mort de l'organisme.

D'une façon générale, l'intoxication ainsi produite peut être faible et alors elle est le plus souvent surmontée par la cellule. Au contraire, cette intoxication est un peu plus forte. Dans ces conditions, elle devient mortelle à la longue pour elle. Enfin, cette même intoxication est très intense. Et alors, elle la tue de suite. Or, en l'espèce, il faudrait que

le corps obtenu avec la cuticule rentrât dans ce dernier cadre.

De plus, l'action d'un poison est très variable. En effet, une dose faible de celui-ci peut tout aussi bien provoquer des réactions chimiques inoffensives, parfois même favorables, comme elle peut engendrer une intoxication très grave causant la mort à brève échéance. Dans ces conditions, le corps obtenu ne devrait pas à petite dose créer de bons effets, mais bien une intoxication rapide du tube mycélien résultant du développement de la zoospore arrêtée.

Enfin, il faudrait que ce produit fût au moins aussi toxique que le sulfate de cuivre lui-même à l'égard de *Pero-nospora viticola*, d'*Aspergillus niger*, de *Botrytis cinerea*, de *Mucor mucedo*. Car sans cela, il pourrait bien se faire qu'il se comportât en présence de ce sel comme *Penicillium glaucum*. Ce champignon, en effet, a une croissance assez appréciable encore lorsqu'on le cultive dans une solution à 21 pour cent de sulfate de cuivre. Cette insensibilité de *Penicillium* à l'égard de ce sel, si généralement toxique cependant, est un exemple de non pénétration de celui-ci dans le protoplasma. Pour qu'une substance ait, en effet, une action toxique ou nutritive, son contact avec le protoplasma ne suffit pas. Il faut qu'il y ait réellement pénétration de celui-ci par celle-là.

Or, dans le cas du *Penicillium glaucum*, PULST « a trouvé si peu de cuivre dans des tapis de champignons développés sur les solutions très riches en cuivre, que cette petite quantité pouvait provenir d'un lavage incomplet et d'une certaine fixation de cuivre dans les parois cellulaires et dans les cellules mortes qui restent interposées dans le mycélium (20). »

Par conséquent, la membrane albuminoïde des tubes mycéliens de *Penicillium glaucum* est réfractaire à toute pénétration de la part du sulfate de cuivre et il ne faudrait

(20) Voir W. PFEFFER, *Physiologie végétale*, t. II, pp. 335 et suivantes.

pas qu'il en fût de même pour *Peronospora viticola* à l'égard du corps engendré au contact des couches cutinisées.

Comme on le voit, le produit résultant de l'action de l'antieryptogamique sur la cuticule, ou inversement, devrait remplir un certain nombre de conditions primordiales. Et dans le cas où il les remplirait, le tube mycélien, en sécrétant le liquide diastasique pour dissoudre la paroi, se trouverait entouré d'une substance toxique qui tuerait son protoplasma, à moins que l'action du poison en présence des substances ainsi engendrées par la liquéfaction de la cuticule ne fût supprimée par sa précipitation ou modifiée par la formation de combinaisons moins actives.

De sorte que, quoique l'infection paraisse surtout se faire à la face inférieure par l'intermédiaire des stomates au bord desquels les zoospores semblent être attirés par chimio-tactisme, il serait, ce nous semble, intéressant, pour prévenir les quelques rares cas d'infection par la face supérieure, de trouver un produit susceptible de former avec les zones cutinisées de la membrane externe un composé qui, dissous par les sucs diastasiques sécrétés au moment de la perforation, deviendrait un toxique violent pour le protoplasma du premier tube mycélien du Mildiou.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous ne nous bornerons pas à exposer, en terminant, les résultats des recherches que nous avons effectuées. Nous préférons résumer, d'une manière succincte, le travail tout entier afin que le lecteur puisse, d'un coup d'œil, en prendre connaissance et juger par là de sa portée scientifique et pratique.

MOTIFS DE NOS RECHERCHES.

En 1885, SCHLÆSING soutient que la plante peut absorber assez de cuivre pour rendre les liquides constitutifs des feuilles incompatibles avec le développement des parasites végétaux.

En 1886, CORNU émet au contraire l'opinion que le cuivre est plutôt retenu par les membranes.

D'où deux opinions différentes provoquant, en 1887, des recherches nouvelles de la part de MILLARDET. L'intérêt capital que présente la résolution de cette question n'échappe pas à ce savant qui étudie, depuis longtemps déjà, le mode d'action de la « bouillie bordelaise » sur le Mildiou.

Résultat principal de ses recherches faites en collaboration avec son collègue GAYON, professeur de chimie organique : la cuticule des feuilles de vigne fixe le sulfate de cuivre (1).

Mais, en 1901, le Professeur DÉVAUX, à la suite de

(1) Cette cuticule était obtenue par l'action de l'acide sulfurique sur les limbes découpés en morceaux.

recherches sur la fixation des sels métalliques par la paroi cellulaire, reconnaît que seuls les tissus de nature cellulosopectosique fixent ces sels et, partant, le sulfate de cuivre.

En 1903, le Professeur BOUYGUES, en présence d'opinions aussi différentes et à qui n'échappe pas non plus l'intérêt pratique de la solution à cette question, fait une série de recherches sur la cuticule fraîche et conclut à la non fixation du sulfate de cuivre par la cuticule.

Mis à notre tour devant des résultats aussi contradictoires par le Professeur BOUYGUES, nous entreprenons, sur ses conseils, de départager ces savants. La divergence de ces résultats est donc la cause efficiente de nos recherches.

GÉNÉRALITÉS SUR LA CUTICULE.

Connaissances imprécises et contradictoires sur la constitution chimique de la cutine, sur la nature et le mode de formation de la cuticule ; données qui ne sauraient nous aider à orienter et à réaliser nos recherches, mais non dénuées cependant d'intérêt puisque de la constatation de leur imprécision naît la nécessité de recherches nouvelles.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Mais ces imprécisions, ces contradictions laissent entière la question : la cuticule fixe-t-elle les sels de cuivre ?

Pour y répondre, deux méthodes :

1° Méthode de macération : coupes macérant plus ou moins longtemps dans une solution saline ; révélation de celle-ci par réactif approprié (en l'espèce : solution de ferro-cyanure de potassium).

2° Méthode d'imbibition : goutte d'une solution saline déposée sur la portion de surface d'un limbe dépourvue, autant que faire se peut, de blessures et y séjournant plus ou moins longtemps. Constatation de la pénétration de la

liqueur par changement de couleur du parenchyme chlorophyllien et, à l'aide des coupes faites dans cette région, lesquelles traitées par réactif approprié (solution de ferrocyanure de potassium) permettent de voir si la cuticule a retenu le métal.

Méthode de macération.

A) Feuilles âgées : la cuticule ne fixe pas les sels de cuivre. Cette non fixation est indépendante de la durée de macération, du degré de concentration de la solution, de l'action plus ou moins prolongée de l'eau de Javel, de la nature du sel, de la température, même lorsque celle-ci est plus élevée que la température normale.

B) Feuilles jeunes : mêmes résultats.

Méthode d'imbibition.

A) Feuilles âgées.

a) Feuilles sans stomates à la face supérieure du limbe et à cuticule épaisse ou mince : pas trace de fixation par la cuticule, même après 120 heures de contact. La cuticule ne se laisse pas non plus traverser, car la zone celluloso-pectosique de la membrane externe des cellules épidermiques ainsi que les membranes, de même nature, des éléments sous-jacents à celles-ci, ne se colorent pas en rose saumon au contact du ferrocyanure de potassium.

b) Feuilles avec stomates à la face supérieure du limbe : pénétration irrégulière de la solution par les stomates, puisque existence de plages de couleur marron plus ou moins foncé, mais nulle fixation de la part de la cuticule. Par contre, tout ce qui est celluloso-pectosique est coloré en rose.

B) Feuilles jeunes : mêmes résultats.

Dans les deux cas, un revêtement cireux ne favorise en rien la fixation des sels.

Mais les stomates ne sont pas les seules portes d'entrée des solutions. En général, toute blessure, naturelle ou artificielle, intéressant profondément un limbe et insuffisamment cicatrisée peut favoriser la pénétration.

Influence des acides forts.

a) Méthode de macération.

A la température ordinaire.

Après l'action de l'acide sulfurique, pas de fixation.

Après l'action de l'acide azotique, pas de fixation.

b) Méthode d'imbibition : résultats identiques.

Les acides forts agissant à la température ordinaire sont donc sans action pour provoquer la fixation des sels de cuivre par la cuticule.

Fixation des sels cupriques de la « bouillie ».

Non fixés, non plus, par la cuticule. Mais peuvent attaquer plus ou moins partiellement le parenchyme chlorophyllien, si les limbes présentent des blessures profondes insuffisamment cicatrisées, d'où production de taches marron réparties irrégulièrement dans sa masse : taches que les viticulteurs désignent sous le nom de « brûlure ».

Donc, conformément à ce qu'a écrit le Professeur BOUYGUES et contrairement à ce qu'ont affirmé MILLARDET et GAYON, la cuticule ne fixe pas les sels de cuivre.

La divergence des résultats obtenus par ces savants n'est qu'apparente. Elle s'explique en se souvenant que MILLARDET et GAYON préparaient la cuticule par la destruction cellulaire à l'aide de l'acide sulfurique. Mais quelles que soient les précautions prises et quoique GAYON ait affirmé le contraire, il reste toujours, rattachées dans ces conditions à la cuticule, des portions charbonneuses qui deviennent le siège unique du phénomène d'adsorption :

phénomène extrêmement intensifié encore par le mode d'expérimentation que ces savants employaient. Au contraire, le Professeur BOUYGUES effectuait ses recherches sur la cuticule fraîche, attenante à la feuille vivante ; et, dans ce cas, le même phénomène ne se produisait qu'avec les tissus celluloso-pectosiques.

Colorants anticryptogamiques.

Mais les « bouillies » ne sont pas les seuls produits anticryptogamiques en usage. Il y a aussi les colorants anticryptogamiques. Or, ceux employés jusqu'ici ne sont pas, eux non plus, fixés par la cuticule, du moins si la face supérieure des limbes est indemne de toute blessure.

Durée du rôle anticryptogamique joué par les agents étudiés.

La durée du rôle anticryptogamique des divers agents étudiés est fonction de leur degré d'adhésivité aux limbes. Plus cette adhésivité est grande et plus l'action de l'anticryptogamique est de longue durée, à la condition toutefois qu'il soit lentement soluble dans les eaux météoriques. Cependant, il est nécessaire qu'il y soit assez soluble pour que sa solution devienne susceptible de frapper d'irréversibilité le gel protoplasmique des filaments mycéliens et, partant, de le tuer sans toutefois être capable de provoquer des plages nécrosées dans le parenchyme chlorophyllien, si par hasard il était amené à pénétrer dans sa masse.

Serait-il avantageux pour la plante que l'anticryptogamique formât un composé, anticryptogamique lui-même, avec la cuticule de la face supérieure du limbe ?

Tout dépend du lieu où se fait l'infection. Or, à ce propos, les avis sont très partagés. Pour les uns, celle-ci ne se fait

jamais par la face supérieure (MÜLLER-THURGAU, GREGORY). Pour les autres (MILLARDET, HARTIG, PRILLEUX, etc., etc.), elle peut s'y produire. Mais, dans la majorité des cas, étant donnée l'orientation particulière de la face supérieure des limbes de la vigne, c'est cette dernière qui reçoit surtout le plus grand nombre des conidies apportées par le vent. C'est sur elle encore que les zoospores engendrées nagent dans l'eau qui la recouvre et peuvent passer à la face inférieure qui, elle aussi, peut être recouverte d'eau grâce à des précipitations atmosphériques de toute nature (pluie, rosée). Puis là, une fois arrêtées, elles produisent l'infection en faisant pénétrer par les stomates les tubes mycéliens auxquels elles donnent naissance et qui semblent attirés vers les ostioles par chimiotactisme.

Donc, pour les zoospores qui émigrent à la face inférieure où elles effectuent la contamination des limbes, un anticryptogamique tel que nous l'avons défini plus haut est certainement suffisant.

Mais pour les zoospores arrêtées qui sont susceptibles de provoquer l'infection du limbe par la face supérieure et qui, grâce aux diastases que sécrètent les tubes mycéliens, solubilisent la cuticule au point où les extrémités de ceux-ci sont en contact avec elle, il serait intéressant de voir les couches cutinisées former avec un produit donné un nouveau corps, anticryptogamique lui-même. Car, au moment de la solubilisation de la cuticule, sur ce point de pénétration du mycélium, le protoplasma de celui-ci serait frappé d'irréversibilité et, partant, serait tué à moins toutefois que le pouvoir fungicide de l'anticryptogamique ne fut annulé par précipitation ou diminué par la formation de combinaisons moins actives.

En somme, dans l'état actuel de nos connaissances scientifiques, la durée du pouvoir fungicide des anticryptogamiques se résume à une question de durée de contact de ceux-ci avec la feuille et en un pouvoir adhésif très grand

de leur part, lequel assure pendant longtemps l'immunsation de la face supérieure du limbe. *Quant à la cuticule, elle est entièrement réfractaire à toute fixation des anti-cryptogamiques étudiés et usuels.*

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	9

CHAPITRE PREMIER

Généralités sur la constitution histologique de la paroi externe des cellules épidermiques	17
Coup d'œil général sur l'histochimie de la cuticule	17

CHAPITRE II

Recherches personnelles, Technique des recherches . . .	35
I. — Méthode de macération	35
A. — Feuilles âgées	35
a) Influence de la durée de la macération	36
b) Influence de la concentration saline	37
c) Influence de l'eau de Javel	37
d) Influence de la nature du sel	38
e) Influence de la température	39
B. — Feuilles jeunes	40
Conclusions	40
II. — Méthode d'imbibition	41
A. — Feuilles adultes	43
a) Feuilles sans stomates à la face supérieure du limbe et à cuticule épaisse	43
b) Feuilles sans stomates à la face supérieure du limbe et à cuticule mince	44
c) Feuilles avec stomates à la face supérieure du limbe.	45
B. — Feuilles jeunes	50
a) Feuilles jeunes sans stomates à la face supérieure du limbe et à cuticule épaisse	51

	Pages
b) Feuilles jeunes sans stomates à la face supérieure du limbe et à cuticule mince	51
c) Feuilles jeunes avec stomates à la face supérieure du limbe	51
Conclusions	53
Autres portes d'entrée des solutions salines à l'intérieur du limbe	53
Conclusions	56
Rôle des acides dans la fixation du sulfate de cuivre par la cuticule	57
A. — Acide sulfurique	57
B. — Acide azotique	58
Conclusions	59
Action des sels de cuivre de la « Bouillie bordelaise » sur la cuticule	60
Conclusions	77
Essai d'explication de la divergence des résultats acquis par Millardet et Gayon et par M. Bouygues	77
Conclusions	79

CHAPITRE III

La cuticule et les colorants anticryptogamiques	81
Historique	81
Recherches personnelles	90
I. Méthode de macération	91
II. Méthode d'imbibition	92
Conclusions	94
Durée de l'immunité donnée aux feuilles par les agents anticryptogamiques étudiés	95
Serait-il avantageux pour la plante que l'anticryptogamique formât un composé anticryptogamique lui-même, avec la cuticule de la face supérieure du limbe?	97
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	113

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

LA SEXUALITÉ CHEZ LES EUMYCÈTES

(Basidiomycètes et Ascomycètes)

Vu et approuvé :

Caen, le 29 novembre 1933.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

BLANC.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Caen,

Louis MAIGRON.

Bordeaux. — Imprimerie E. DROUILLARD, place de la Victoire, 3.
